

TESES DE DOUTORAMENTO



Cd rom in

2003 a 2016

RESUMOS

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Biblioteca

Teses de Doutoramento

Índice

ANTUNES, Maria Lina (2016) Malária grave: marcadores clínicos e imunológicos de gravidade e prognóstico. Dissertação de Doutoramento no ramo de Medicina Tropical, especialidade de Patologia Tropical. IHMT. Lisboa.	6
MORENO, Marta Sofia Mano (2016) Adesão à terapêutica Anti-retroviral em Maputo: o contributo de uma abordagem <i>bottom-up</i> . Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.	7
OLIVEIRA, Miguel André Fouto Pinho de (2016) Avaliação espacial da influência dos factores socioeconómicos na Mortalidade por Acidente Vascular Cerebral na População de Portugal Continental. Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.	8
SALVADOR, Sílvia Filipa Alves Beato (2016) Contributo para o estudo da caracterização genética de estirpes portuguesas de <i>Echinococcus granulosus</i> . Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	9
BIGOT, Ana Carina Jorge dos Santos Borges (2015) Alcohol consumption in the African contexto: Contributions to a public health approach to policy decisions, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.	10
FIGUEIREDO, Jacinta Teresa Gomes Chaves de Matos (2015) Lesões causadas pelos ovos de <i>Shistosoma haematobium</i> como factor de risco em doenças crónicas urinárias das zonas endémicas de Angola. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	12
LOBO, Elsa da Conceição (2015) Contribuição para o estudo da resposta terapêutica <i>in vivo</i> às combinações baseadas em derivados da Artemisinina no tratamento da Malária em Maputo. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	13
REIS, Verónica Batista Gonçalves dos (2015) A saúde sexual e reprodutiva na formação médica: O caso de Moçambique e da Bahia-Brasil, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.	14
SILVA, Renato Fernandes Pinheiro da (2015) Funcional analysis of genes differentially expressed in salivary glands of <i>Anopheles coluzzii</i> and <i>Anopheles stephensi</i> in response to infection by <i>Plasmodium berghei</i> . Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Celular e Molecular. IHMT. Lisboa.	15
COELHO, Anabela Pereira (2014) Análise de uma política pública de saúde: Gestão Integrada da Doença, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.	16
COSTA, Pedro Nisa (2014) Improved nucleic acid testing strategies to detect and discriminate veterinary relevant Mycobacterium tuberculosis complex members, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.	17

COSTA, Sofia Maria Mourão Marques dos Santos (2014) Efflux pump activity in drug resistance of <i>Staphylococcus aureus</i> . Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.	18
MACHADO, Diana Isabel Oliveira (2014) The dynamics of drug resistance in <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> : exploring the biological basis of multi – and extensively drug resistant tuberculosis (MDR/XDRTB) as a route for alternative therapeutic strategies. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.	20
MENDES, Cristina Isabel (2014) Population diversity and transmission dynamics of <i>Plasmodium sp.</i> . Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	21
NETO, Zoraima Naymbi da Silva (2014) – Biological characterization of de ubiquitylating enzymes (UBPs/UCHs) in <i>Plasmodium spp</i> as potential drug targets Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	22
ROCHA, Diara Kady Monteiro Vieira Lopes (2014) Plantas medicinais tropicais e mediterrânicas com propriedades biocidas no controlo de insetos vetores de agentes patogénicos. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	23
SIMÕES, Maria Luísa (2014) – Hemozoin as an immune stimulant of the mosquito <i>Anopheles gambiae</i> response against the malaria parasite. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Celular e Molecular. IHMT. Lisboa.	24
TEMIDO, Marta (2014) – Exequibilidade de uma revisão da combinação de papéis profissionais entre médicos e enfermeiros em Portugal. Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.	25
ALVES, Carolina Alpalhão Mantero de Mendonça (2013) – Characterization of the hepatitis delta virus small antigen: intracellular localization, structure, multimerization and RNA binding ability. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular e Celular. IHMT. Lisboa.	26
ANTUNES, Sandra Isabel da Conceição (2013) Differential expression and functional characterization of cattle tick genes in response to pathogen infection (<i>Babesia bigemina</i>). Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	27
COSTA, Cristina Isabel Correia de Almeida (2013) Generation and characterisation of monoclonal antibodies against cell cycle and cytokinesis regulators in <i>Trypanosoma brucei</i> , Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	28
MACHADO, Patrícia Isabel Pires (2013) Pyruvate kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiencies and their association with malaria: population genetics and proteomic studies, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade Parasitologia. IHMT. Lisboa.	29
SILVA, Bruno Gomes da Silva (2013) Genetic studies on the mosquito vector <i>Culex pipiens</i> , Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	31
CODICES, Vera Alexandra da Rosa (2012) Infecção por <i>Cryptosporidium parvum</i> : resposta imunitária e tecnológica de anticorpos monoclonais para o diagnóstico,	

Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	32
FERREIRA, Pedro Manuel Machado Carlos (2012) <i>Lymnae truncatula</i> em Portugal contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade Parasitologia. IHMT. Lisboa.	33
LAIRES, Raquel de Sá da Silva (2012) <i>Trypanosoma brucei brucei</i> peptidase inhibitors Immunolocalization, secretion and potential use as targets for therapy, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Celular e Molecular. IHMT. Lisboa.	34
MONTEIRO, Maria Fernanda Afonso Dias (2012) Efeito dos factores do hospedeiro e parasitários na susceptibilidade à Malária e gravidade da Doença, Dissertação de Doutoramento no ramo de Medicina Tropical, especialidade em Patologia e Clínica das Doenças Tropicais. IHMT. Lisboa.	35
BISCAIA, André Rosa (2011) Satisfação no trabalho dos médicos de família dos Centros de Saúde Portugueses, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa	36
CAMPOS, Paulo Adão de (2011)- Caracterização de factores de risco da malária placentária por <i>Plasmodium falciparum</i> em Luanda. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	38
CASACA, Ana Leonor Vidal Gomes (2011) Uma abordagem yeast <i>two hybrid</i> para o estudo da replicação e patogénese do vírus da hepatite delta, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Celular e Molecular. IHMT. Lisboa.	40
CONCEIÇÃO, Maria Cláudia Rodrigues da (2011) Hospitais de primeira referência: distrito de saúde e estratégia dos cuidados de saúde primários em Moçambique, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.	41
FÉLIX, Rute Castelo (2011) The role of detoxification in the mosquito <i>Anopheles gambiae</i> response to <i>Plasmodium</i> infection, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade Parasitologia, IHMT, Lisboa.	43
FORTES, Filomeno Coelho (2011) Perfil epidemiológico das principais doenças parasitárias endémicas em Angola: malária tripanossomose humana africana oncocercose schistosomose urinária, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade Parasitologia, IHMT, Lisboa.	44
MENDES, Marta Maria Lavouras (2011) Analysis of changes in the host cell proteome during hepatitis D virus infection, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Celular e Molecular. IHMT. 2011.	48
NOGUEIRA, Paulo Jorge (2011) Ondas de calor: modelos de medição previsão e monitorização dos impactos na saúde, Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.	49
AGOSTINHO, Maria Helena (2010) Opções de utilização sequencial de anti retrovíricos em doentes com falência terapêutica em Angola, Dissertação de Doutoramento no ramo de Medicina Tropical, especialidade de Patologia e Clínica das Doenças Tropicais. IHMT. Lisboa.	54
AGUIAR, Pedro Vargues de (2010) Factores de prognóstico do resultado do tratamento de doentes com Síndrome de Dependência do Álcool: estudo de coorte prospectivo de 6	

meses, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde e Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.....	56
ALVES, Joana Baptista (2010) Epidemiologia da malária em Santiago Cabo Verde: factores genéticos humanos e estrutura populacional do mosquito vector, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.....	59
COSTA, Maria Ferreira da (2010) Epidemiologia e caracterização de espécies implicadas na microsporidiose humana em Portugal por análise parasitológica e molecular, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.....	60
ESTEVES, Francisco de Carvalho (2010) Identificação de múltiplos marcadores polimórficos em <i>Pneumocystis Jirovecii</i> : relação com a evolução clínica, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.....	65
FRONTEIRA, Inês (2010) Saúde dos enfermeiros: contributos para a sua compreensão, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.....	67
MARTINS, Ana Fernandes (2010) Activity of compounds Isolated from <i>Carpobrotus edulis</i> on Efflux Pumps of Bacteria and Cancer Cells, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.....	76
RODRIGUES, Liliana Dias (2010) The role of the efflux mechanisms in multidrug resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.....	79
RODRIGUES, Louise Pereira (2010) Early detection of the biological and genetic determinants of resistance to artemisin based combination therapy in malaria parasites, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.....	81
ALMEIDA, Afonso (2009) Estudos epidemiológicos e resistência aos antimaláricos em Timor Leste, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.....	84
BORGES, Sofia Trindade (2009) Identification of genes determining mefloquine resistance in malaria parasites, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.....	84
COSTA, João Borges (2009) Infecções sexualmente transmissíveis em adolescentes prevalência e associação com factores sócio demográficos, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.....	85
CRAVEIRO, Isabel Rodrigues (2009) Mulheres em idade fértil e pobreza: formas de acesso e padrões de utilização de saúde reprodutiva, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.....	86
FIGUEIREDO, Cristina Furtado (2009) Transmissão recente da infecção pelo complexo <i>mycobacterium tuberculosis</i> na região de saúde de Lisboa e Vale do Tejo em 2003. Contributo epidemiológico, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa. ...	91
FREITAS, Natália Bezerra de (2009) Estudo do tráfego nucleocitoplasmático do vírus da hepatite delta, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade Biologia Celular e Molecular. IHMT. Lisboa.....	93

MARTINS, Tiago Lopes (2009) Identification of proteases as diagnostic and targets in bovine babesiosis, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	95
RODRIGUES, Olívia Roos (2009) Análise funcional da imunidade celular na infecção por <i>Leishmania Infantum</i> , Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	98
BONFIM, Idalina dos Ramos (2008) HIV 1 na República Democrática de São Tomé e Príncipe: estudos sobre a situação actual; Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.	99
CALADO, Maria Manuela (2008) Estudos ecológicos e moleculares dos hospedeiros intermediários <i>Planorbarius metidjensis e Bulinus truncatus</i> de Portugal, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	100
CORTES, Sofia Júdice (2008) Diversidade genética da população parasitária de <i>Leishmania</i> em Portugal, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	102
FERNANDES, Natérica Pedro (2008) Contribuição para o estudo de resistência aos antimaláricos e análise de marcadores moleculares de <i>Plasmodium falciparum</i> e do hospedeiro humano, em Maputo, Moçambique, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	103
FERREIRA, Isabel Dinis (2008) Estudos de susceptibilidade à artemisinina e derivados em <i>Plasmodium falciparum</i> , Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	104
LOPES, Luís da Silva (2008) Efeito da refeição sanguínea anticorpos e infecções mistas no desenvolvimento esporogónico de <i>Plasmodium spp</i> , Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	105
MAIA, Carla Soares (2008) Interação parasita hospedeiro e susceptibilidade de <i>leishmania infantum</i> a fármacos, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	106
MARTINS, Marta Lopes (2008) The role played by efflux systems on the resistance to antibiotics, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.	108
MARTINS, Marta Lopes (2008) The antimycobacterial activity of thioridazine derivatives against drug resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : In vitro, ex vivo and in vivo studies, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.	110
NOVO, Maria Teresa (2008) Contributo para o estudo bioecológico de <i>Culex theileri</i> Theobald 1903 e <i>Ochlerotatus Ochlerotatus caspius</i> Pallas 1771 Diptera Culicidae na área da Comporta Alcácer do Sal. Perspectivas para o seu controlo. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	111
RAMOS, Susana Garcia (2008) Studies on the mosquito immune response effect of antimalarial drugs and <i>Plasmodium</i> sporozoites –Glycosylphosphatidylinositol from Apicomplexan protozoa, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.	111
SOUSA, Carla Alexandra (2008) Malaria vectorial capacity and competence of <i>Anopheles atroparvus</i> Van Thiel 1927 (Diptera Culicidae) Implications for the potential	

- re-emergence of malaria in Portugal, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa..... 111
- ABRANTES, Patrícia Simões (2007) Efeito da cloroquina na modulação da resposta do mosquito vector à infecção por plasmodium, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa. 113
- NOGUEIRA, Maria Carvalho (2007) Estudos de biologia da multiresistência a antimaláricos em *Plasmodium falciparum* : transportadores ABC e genes de resposta ao stress oxidativo, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa. 114
- RODRIGUES, Ana Afonso (2007) Studies on the genetics of artemisinin resistance in Malaria, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa. 115
- SANTOS, Ana Pereira dos (2007) *Anaplasma phagocytophilum* and human granulocytic anaplasmosis in Portugal, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa. 116
- ALVES, Maria Margarida (2006) Caracterização epidemiológica da criptosporidiose em Portugal, por estudo molecular de isolados de *Cryptosporidium* spp de humanos e de animais, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa. 117
- LEIRIÃO, Patrícia Rodrigues (2006) Plasmodium-Hepatocyte interactions: implications for protection against Malária, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa. 119
- SILVA, Marina Henriques da (2006) Estudo da resistência de *Pneumocystis jirovecii* ao cotrimoxazol em doentes com infecção VIH/SIDA, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa. 121
- VIEIRA, Maria Luísa Jorge (2006) Aspectos da caracterização antigénica e molecular da Leptospirose em áreas endémicas, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa. 123

ANTUNES, Maria Lina (2016) Malária grave: marcadores clínicos e imunológicos de gravidade e prognóstico. Dissertação de Doutoramento no ramo de Medicina Tropical, especialidade de Patologia Tropical. IHMT. Lisboa.

A malária grave, maioritariamente causada pelo *Plasmodium falciparum*, continua a ser uma das principais causas de morte por infeção no mundo, principalmente na África subsariana. A aquisição de imunidade na malária é lenta e para ser mantida requer a exposição a variantes antigénicas múltiplas do parasita e a maturação do sistema imune do hospedeiro. Existem evidências da imunidade protetora poder estar associada à intermutabilidade de classes e subclasses dos anticorpos gerados. Em Angola a malária foi a principal causa de morbilidade e mortalidade notificada em 2013. Muitos doentes autótonos e residentes apresentam quadros clínicos com gravidade apesar de baixa parasitémia periférica observada na microscopia ótica. Com a finalidade de contribuir para o conhecimento da doença e da resposta imune humoral nos doentes com malária grave, foi efetuado um estudo observacional prospetivo de uma população de 101 doentes, internados no Serviço de

Cuidados Intensivos (SCI) do Hospital Américo Boavida (HAB) em Luanda durante o período de 2 anos. A amostra por conveniência, incluiu doentes com 10 ou mais anos de idade, com diagnóstico de malária grave de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde confirmado por gota espessa e/ou teste rápido (TRD) e a presença de mais do que uma disfunção orgânica. A espécie infetante foi confirmada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os doentes foram caracterizados segundo o sexo, idade, naturalidade e residência e existência ou não de co-morbilidade. A gravidade e o prognóstico da doença foram avaliados segundo o SOFA score médio (média dos piores valores laboratoriais e fisiológicos obtidos diariamente nos três primeiros dias de internamento). O SOFA médio foi comparado com o SOFA_{max} e *delta*SOFA (diferença entre o valor máximo e mínimo do SOFA dos três primeiros dias de internamento). Para o estudo da imunidade específica foram doseados os anticorpos anti-*P. falciparum* (IgG, IgM e subclasses de IgG) no soro dos doentes em estudo, utilizando a técnica de imunoensaio enzimático (ELISA).

Todos os resultados obtidos foram relacionados com a parasitémia periférica, gravidade da doença e prognóstico utilizando o programa estatístico IBM SPSS versão 21. A infeção por *P. falciparum* foi confirmada por PCR em todos os doentes em estudo e registou-se coinfeção com *P. malariae* em quatro dos doentes. Os doentes do presente estudo eram maioritariamente autotones e residentes, predominando o sexo masculino e com média de idade de 21 anos. A pontuação do SOFA médio foi de $8,92 \pm 3,81$. A mortalidade observada (16,8%) foi muito inferior à esperada pelo SOFA médio, principalmente nos doentes com pontuações mais elevadas. O *delta*SOFA manteve baixa capacidade de discriminação para a mortalidade observada nos doentes estudados com malária grave. Apesar da gravidade do quadro clínico, mais de metade dos doentes mostrou baixa parasitémia periférica ($\leq 2\%$) à admissão e não se encontrou correlação entre a parasitémia e a mortalidade. Os valores dos anticorpos IgG e IgM anti-*P. falciparum* estiveram elevados em todos os doentes em estudo, mas não se encontrou associação estatisticamente significativa com a parasitémia nem com a mortalidade.

MORENO, Marta Sofia Mano (2016) Adesão à terapêutica Anti-retroviral em Maputo: o contributo de uma abordagem *bottom-up*. Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa

A Adesão à Terapêutica Anti-retroviral (TARV) pertence ao grupo das maiores preocupações de saúde pública na área do VIH. O único factor de possibilidade de controlo de sucesso da TARV por parte do paciente VIH+ é o comportamento de adesão ao tratamento. As características do próprio paciente, o enquadramento sócio-cultural do VIH na comunidade e no país, a qualidade da relação com os profissionais de saúde e as próprias dificuldades com o tratamento, são factores amplamente estudados nas últimas décadas, e que medeiam o sucesso da adesão à TARV. A partir de uma abordagem *bottom-up*, desenvolveu-se um estudo exploratório com o objectivo de explorar o modo como pacientes TARV em Maputo experienciam estes factores e o impacto dessa experiência na adesão à TARV. A investigação contou com a

colaboração de 602 utentes em TARV na Cidade de Maputo com idades entre os 21 e os 56 anos. Os resultados obtidos ao longo dos quatro estudos realizados indicam que mais homens revelaram ter interrompido o tratamento que as mulheres, e maioritariamente por mal-estar físico ou por indicação médica. Ao contrário dos homens, as mulheres são quem mais revela ter dificuldades com os profissionais de saúde, assim como, interromper o tratamento por faltas às consultas. A adesão à TARV é mais reduzida quando na presença das seguintes características: género masculino; medos relacionados com estigma e discriminação, com falhar a toma da TARV ou com não sentir melhoras com o tratamento; ter tido dificuldades com os profissionais de saúde, nomeadamente, o paciente sentir que não tem as suas dúvidas esclarecidas, que o médico só se preocupa com a medicação, que o médico não o compreende e que não cria espaço para que o paciente aborde outros aspectos relacionados com a sua saúde. A investigação apela ao desenvolvimento de intervenções que atendam às diferenças de género, nomeadamente no relacionamento com os profissionais de saúde, família e activistas, que possibilitem o desenvolvimento de estratégias de *coping* com a TARV mais suportadas socialmente. Encoraja-se a continuação do desenvolvimento de actividades formativas da sociedade em geral, sobre o VIH e a TARV. A necessidade de diminuição do estigma é uma das maiores preocupações levantadas por este trabalho.

OLIVEIRA, Miguel André Fouto Pinho de (2016) Avaliação espacial da influência dos factores socioeconómicos na Mortalidade por Acidente Vascular Cerebral na População de Portugal Continental. Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) constitui um problema de Saúde Pública de grande magnitude, tanto em mortalidade como morbilidade. Em 2010, representava, globalmente, a segunda maior causa de morte e a terceira causa de anos de vida perdidos ajustados pela incapacidade. A sua evolução temporal também traz preocupações, pelo aumento estatisticamente significativo, entre 1990 e 2010, verificado em indicadores como os anos de vida potencialmente perdidos e total de sobreviventes a um episódio.

Embora ocorra mais frequentemente em adultos de meia-idade ou em idosos, entre 1990 e 2010 foi registado um aumento global e significativo na incidência em pessoas com idades compreendidas entre 20 e 64 anos de idade, para o qual contribuíram substancialmente países de baixo e médio rendimento.

Esta situação, aliada ao facto, apontado por alguns autores, do risco de AVC apresentar padrões diversos de distribuição geográfica entre países mas também entre regiões do mesmo país, levanta interrogações acerca da importância dos determinantes socioeconómicos para a mortalidade e morbilidade por esta doença, bem como acerca da variação espacial da associação entre estes determinantes e o risco de AVC.

Assim, foram aqui operacionalizados dois estudos com o objectivo de avaliar a variação espacial da associação entre mortalidade por AVC e determinantes socioeconómicos, tendo como área de estudo o território de Portugal Continental.

Um dos estudos investigou a variação geográfica e temporal da associação entre determinantes pertencentes a várias categorias representativas do estatuto socioeconómico (por exemplo o nível de escolaridade) e mortalidade por AVC em pessoas abaixo dos 65 anos de idade, tendo como unidade estatística o município. Este coorte populacional suscitou interesse pela presente situação de crise económica e seus potenciais impactos na população em idade laboral.

No segundo estudo abordou-se essencialmente o coorte populacional inverso, a população com mais de 64 anos de idade, tendo como unidade estatística a freguesia.

Investigou-se a variação espacial da associação entre condições adversas de habitabilidade (por exemplo a incapacidade de aquecer a habitação no Inverno) e a mortalidade por AVC, pois a evidência existente sugere que este coorte populacional possa ser mais afectado por esta categoria de determinantes socioeconómicos.

Os resultados de ambos os estudos permitiram constatar de forma expressiva a presença de variação espacial na associação entre cada grupo de determinantes socioeconómicos e o risco de AVC nos coortes populacionais investigados. Em ambos os casos, foi possível avaliar quais os determinantes mais relevantes para o risco de AVC e analisar a variação da força e sinal (positivo ou negativo) das associações ao longo do território. O nível de escolaridade surgiu no primeiro estudo como factor protector em geral, mas como factor de risco em certas zonas do território. A incapacidade de aquecer a habitação no Inverno revelou-se no, segundo estudo, como um potencial factor de risco, particularmente na área noroeste do território continental português.

Os resultados obtidos sugerem que as metodologias testadas poderão contribuir para a vigilância epidemiológica do AVC, por exemplo na selecção de áreas de intervenção prioritária para acções de prevenção ou mitigação desta doença.

SALVADOR, Sílvia Filipa Alves Beato (2016) Contributo para o estudo da caracterização genética de estirpes portuguesas de *Echinococcus granulosus*. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

A hidatidose/equinococose é uma zoonose causada pelo céstode *Echinococcus granulosus*, juntamente com as suas variantes específicas denominadas de genótipos. Estão descritos 11 genótipos diferentes sendo que alguns destes já obtiveram o estatuto de novas espécies de *Echinococcus* e outras foram reorganizadas em complexos crípticos de espécies. O ciclo de vida do parasita é maioritariamente doméstico, tendo canídeos como hospedeiros definitivos e pequenos ruminantes e gado bovino como hospedeiros intermediários. O Homem é considerado um hospedeiro acidental. Embora a hidatidose/equinococose seja um problema de Saúde Pública em Portugal, existem poucos dados epidemiológicos sobre a infecção por este parasita e esses são apenas referentes a alguns hospedeiros intermediários. O principal objectivo deste trabalho é caracterizar geneticamente as amostras de *Echinococcus* obtidas em Portugal e estudar as relações filogenéticas destas com as amostras descritas em todo o mundo.

Foram obtidas 211 amostras provenientes de matadouros portugueses, sendo 175 de ovinos, 3 de caprinos e 32 de bovinos. Foi ainda obtida uma amostra de um humano. Foram ainda utilizadas neste estudo três amostras provenientes de búfalos de Itália e duas amostras provenientes de ovinos do Brasil. Com as amostras férteis (n=72) foi feita a caracterização molecular para fragmentos de genes mitocondriais.

A análise molecular das amostras de fígado, rim, pâncreas e pulmão, identificou a maior parte como pertencendo ao complexo G1-G3 de *E. granulosus sensu stricto*. Uma amostra foi identificada como *E. canadensis* genótipo G7. Com base nas sequências concatenadas dos genes *cox1+ATP6+rrnL+rrnS* (~2600pb) foi efectuada inferência filogenética a qual demonstrou probabilidade de segregação de três amostras portuguesas juntamente com sequências de referência do genótipo G3 do *E. granulosus* s.s.. Foi observada uma elevada fertilidade (~30%) nos quistos hidáticos provenientes de ovinos, tendo um elevado potencial infeccioso para os diversos hospedeiros intermediários, informação que está de acordo com o observado com outros estudos realizados na Europa.

As 71 amostras portuguesas identificadas como pertencentes ao complexo de genótipos G1-G3 estão dispersas no Centro e Sul de Portugal, sendo este o complexo genético mais comumente encontrado nos animais de pastoreio e no gado bovino. Foi identificada uma amostra de bovino como pertencendo ao genótipo G7 do complexo *E. canadensis* que pode ser um alerta para a possibilidade de transmissão deste genótipo entre o gado bovino, facto que ainda não tinha sido descrito até à actualidade.

Foi também efectuada análise filogenética com base em dois fragmentos de genes nucleares que revelaram resultados semelhantes aos obtidos com a análise efectuada com os fragmentos de genes mitocondriais, revelando a presença de uma amostra que segregava juntamente com o complexo *E. canadensis* e todas as outras amostras encontravam-se dentro do complexo *E. granulosus* s.s. genótipos G1-G3.

A zona sul de Portugal (Alentejo), considerada como hiperendémica, continua a ter bastantes situações de abate de animais a nível doméstico, normalmente sem controlo veterinário.

Assim a existência de mais estudos epidemiológicos e moleculares envolvendo outros matadouros, com maior abrangência a nível nacional e contemplando outros possíveis hospedeiros, permitiria evidenciar a situação epidemiológica do *E. granulosus* s.s. no país. Também seria importante a existência de estudos em amostras humanas para uma melhor implementação dos programas de Saúde Pública e para uma opção mais eficaz na escolha de tratamentos para a parasitose.

BIGOT, Ana Carina Jorge dos Santos Borges (2015) Alcohol consumption in the African context: Contributions to a public health approach to policy decisions, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.

A contribuição dos problemas ligados ao álcool para a carga de doenças em África tem sido amplamente negligenciada. Devido a rápidas mudanças no contexto de vários países e a novas evidências científicas relativas a doenças

atribuíveis ao álcool, tais como HIV e a incidência de TB, os problemas e carga da doença em África relacionados com o consumo de álcool podem ser maiores do que o que foi previamente estimado. Ao mesmo tempo existe pouca informação sob a forma como os países estão a gerir o consumo de álcool e as consequências ligadas a esse consumo, o que sugere que uma avaliação das políticas nacionais é necessária nesta região.

O objetivo geral desta tese é o de rever as evidências relacionadas com o consumo de álcool em África e analisar as políticas do álcool existentes, contribuindo assim para a melhoria das decisões políticas relacionadas com esse consumo na região. Em particular, a tese concentra-se nos quatro objetivos específicos seguintes: I) estimar a mortalidade e morbilidade atribuídas ao álcool em África; II) identificar os fatores que podem afetar a magnitude e os padrões de consumo de álcool em África; III) avaliar as respostas políticas nacionais relacionadas com o consumo de álcool em 46 países e sua eficácia para reduzir os malefícios relacionados com esse consumo; IV) documentar as diferentes etapas e atores envolvidos no desenvolvimento de uma política relativa ao consumo de álcool num país Africano (Malawi).

A investigação utilizou diferentes tipos de métodos. Os resultados mostram que o consumo de álcool tem um grande impacto sobre a carga de doença e mortalidade nos países africanos, com o álcool sendo responsável, em 2012, por 6.4% de todas as mortes e 4.7% de todos os DALYs na Região (estudo I). A nossa análise identificou sete fatores que estão intimamente ligados a possíveis mudanças no consumo de álcool em África. Impulsionada em grande parte pela globalização, a convergência potencial desses fatores é suscetível de se associar a um crescimento contínuo no consumo de álcool bem como ao aumento da morbilidade e mortalidade relacionada ao álcool em todo o continente (estudo II). Os países têm vindo a utilizar diferentes tipos de medidas de política para controlar o consumo de álcool. A avaliação dos níveis atuais de restrição das políticas existentes, mostra que os países atingiram uma pontuação média de 44,1 de 100 pontos possíveis, variando entre 9,1 (São Tomé e Príncipe) e 75,0 pontos (Argélia). De acordo com nossos resultados, os níveis de restrição das políticas existentes estão negativamente correlacionados com o consumo de álcool em consumidores atuais ($r_s = -.353$, $p = 0,005$) (Estudo III). O estudo IV reflete as dificuldades e complexidade dos processos políticos e sociais na elaboração de políticas de álcool no Malawi. Apesar da influência da indústria do álcool no estabelecimento da agenda política e no processo de consulta, o nosso estudo demonstra que as organizações da sociedade civil, quando devidamente financiadas e apoiadas, podem desempenhar um papel importante e decisivo na evolução da política do governo com vista a defesa do interesse público.

As frações de mortalidade e morbilidade atribuídas ao álcool em muitos países africanos são consideráveis e, portanto, o álcool não pode ser deixado de fora das agendas de saúde e desenvolvimento desses países. Os governos africanos precisam de ter um papel mais ativo na proteção da saúde da população. Embora os países tenham adotado algum tipo de medidas de políticas para controlar o consumo de álcool, os nossos resultados mostram que há uma necessidade de uma resposta política mais forte para reduzir a carga relacionada com o consumo de álcool no continente. Finalmente, devido às dificuldades inerentes ao desenvolvimento de políticas do álcool, os governos devem considerar fortemente o aumento da participação das organizações da sociedade civil para apoiar uma direção no sentido da defesa do interesse público.

**FIGUEIREDO, Jacinta Teresa Gomes Chaves de Matos (2015)
Lesões causadas pelos ovos de *Shistosoma haematobium* como
factor de risco em doenças crónicas urinárias das zonas
endémicas de Angola. Dissertação de Doutoramento no ramo de
Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT.
Lisboa.**

Resumo: várias espécies de tremátodes do género *Schistosoma*. Considerando que a schistosomose por *S. haematobium*, cujas lesões podem ter graves consequências para a saúde humana, é endémica em Angola, o seu estudo e o seu controlo tornam-se imperiosos. Nesse contexto, a presente tese tem por objetivo geral caracterizar as lesões clinico-patológicas causadas por *S. haematobium* e os potenciais fatores associados à parasitose em Angola.

Durante o período de realização do estudo (2011-2013), 1671 utentes recorreram à consulta de Urologia do Hospital Américo Boavida em Luanda, Angola, dos quais 189 (10,7%) integravam os critérios de inclusão pré definidos. Dos doentes avaliados 97 (51,3%) eram mulheres e 92 (48,7%) homens, com idades compreendidas entre os 14 e 77 anos (média 37,9 anos), originários de 13 das 18 províncias do país.

O exame parasitológico da urina foi positivo em 46 doentes (24,3%), sendo a média da carga parasitária de 23,1 ovos/10ml. Quanto à idade, verificou-se o padrão clássico da parasitose, com o pico da infeção no grupo dos 14-28 anos e com diferenças significativas (χ^2 , $P < 0,001$) em relação aos outros grupos etários. Tanto a infeção como a intensidade do parasitismo eram mais frequentes na população feminina (54,3%) comparativamente ao masculino (45,7%), com diferenças significativas em relação à carga parasitária (χ^2 , $P = 0,044$). A hematúria foi o sinal mais frequentemente referido pelos doentes (93%). Os resultados da ecografia renal e pélvica demonstraram que 167 (88,3%) tinham alterações na bexiga enquanto em 75 (34,4%) se detetaram lesões renais de grau variado.

No exame de uretrocistoscopia verificou-se que a quase totalidade dos doentes (98,4%) apresentava lesões vesicais em diferentes estádios de evolução causadas por *S. haematobium*. Constatou-se uma elevada concordância entre as alterações visualizadas na ecografia com as obtidas na uretrocistoscopia e histologia com os métodos de diagnóstico de tumor vesical, a citologia da urina e o teste NMP22 BladderChek®. A maioria dos doentes apresentava cistite crónica (75,7%) e em 42 (22,3%) foram identificados carcinomas dos tipos epidermoide (CE) e de células transicionais (CCT).

A ocorrência de co-morbilidade de lesões urológicas e schistosomose ectópica foi observada em 28 doentes. Após conduta terapêutica e/ou cirúrgica, 149 doentes tiveram alta por cura e 16 passaram a ser seguidos na Oncologia. A taxa de mortalidade foi de 30% (9/29) nos doentes oncológicos e um caso por insuficiência renal crónica com atrofia renal bilateral. Os resultados preliminares de RAPD-PCR sugerem a existência de alta variabilidade genética inter e intrapopulacional de *S. haematobium* a nível regional. O presente estudo comprova não só a infeção schistosómica na população adulta como evidencia as consequências fisiopatológicas resultantes da retenção crónica dos ovos nos tecidos, com ênfase na associação entre *S. haematobium* e neoplasia da bexiga. Consideramos de maior relevância a inclusão da população adulta nos programas de controlo da schistosomose, de modo a evitar a evolução da doença e a intervenção clínica adequada mais precoce, o que irá permitir um melhor prognóstico e consequente qualidade de vida.

LOBO, Elsa da Conceição (2015) Contribuição para o estudo da resposta terapêutica *in vivo* às combinações baseadas em derivados da Artemisinina no tratamento da Malária em Maputo. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Com o objetivo de reduzir a emergência e propagação de parasitas resistentes aos antimaláricos, a OMS recomenda o uso de terapia combinada à base de artemisinina (ACT) como tratamento de primeira linha para a malária não complicada por *P. falciparum*. A resistência aos ACTs foi recentemente relatada no Sudeste Asiático. Historicamente, a região oriental da África sub-Sahariana tem sido um dos principais focos de disseminação da resistência aos antimaláricos. Em Moçambique, um país da África do Leste, a malária é um grande desafio para a saúde pública, responsável por 56% dos internamentos pediátricos e 26% das mortes intrahospitalares. O tratamento com artesunato e sulfadoxina+pyrimethamina foi implementado em 2004. Esta combinação foi substituída por artesunato+amodiaquina (ASAQ) ou arteméter+lumefantrina (AL) em 2009. Em Moçambique, a resposta terapêutica aos ACTs é pouco estudada, existindo poucos dados sistematizados relativos aos aspetos clínicos e gravidade da doença nos pacientes hospitalizados. Os polimorfismos no gene *pfmdr1* têm sido associados a alterações na susceptibilidade aos antimaláricos, incluindo os ACTs. Em 2014, foi proposto um marcador molecular correlacionando mutações no gene *pfK13* ao fenótipo de susceptibilidade aos ACTs. Os nossos objetivos foram: contribuir para delinear o perfil da resposta terapêutica da malária *falciparum* não complicada (MnC) em pacientes tratados com ACTs em Maputo; contribuir para melhor compreensão do quadro clínico e evolução da malária grave (MG); descrever a frequência de marcadores moleculares de resistência aos antimaláricos usados em Maputo. Foram incluídos 412 pacientes com MnC (2010-2012); 284 foram tratados com AL (106 no Centro de Saúde^{1º} de Maio e 168 no Centro de Saúde de Boane); os restantes 138 foram tratados com ASAQ em Boane. Dois pacientes (tratados com ASAQ) regressaram no D7 com sintomas e parasitémia. Os restantes tiveram resposta adequada até ao D14. Para estudo clínico e evolução da malária grave, foram seleccionados pacientes na enfermaria pediátrica do Hospital Central de Maputo, de Fevereiro a Março de 2012. Dos 129 incluídos, 30 apresentaram malária cerebral (MC) com scores de Glasgow entre 4-9. Cinco destes resultaram em óbito nas primeiras 24h após admissão. Os pacientes portadores do genótipo *RNAse3* GG apresentaram score de Glasgow inferior à admissão, embora sem diferença significativa. Para analisar a tendência temporal da frequência de marcadores moleculares de resistência aos antimaláricos em Maputo, foi incluído um grupo de amostras de ADN de um estudo anterior realizado entre 2003 e 2005. Em relação aos SNPs *pfmdr1* 86Y, Y184, 1246Y: a frequência dos alelos N86 e D1246 aumentou significativamente de 2003-2005 para 2010-2012; o aumento da frequência do 184F não foi significativo; exceto para NFD e NYD, a frequência de haplótipos triplos diminuiu em 2010-2012. Das 99 amostras analisadas somente 3 possuíam duas cópias *pfmdr1*. Em 100 amostras, não foram identificadas mutações *pfK13* relacionadas com a resistência aos ACTs no Sudeste Asiático. Em 2 amostras coletadas após introdução dos ACTs foi

identificado um novo polimorfismo no *pfk13* (ausente em 2003-2005). Este SNP (V494I) é adjacente à mutação Y493H no *pfK13*, associada à resistência.

REIS, Verónica Batista Gonçalves dos (2015) A saúde sexual e reprodutiva na formação médica: O caso de Moçambique e da Bahia-Brasil, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.

Este estudo teve como finalidade analisar a estrutura e conteúdos da formação médica na temática da Saúde Sexual e Reprodutiva (SSR) com vista a averiguar se o médico formado consegue adquirir suficiente capacidade para contribuir, de forma efectiva, na prestação de serviços primários de SSR. Para atingir os objectivos propostos foi realizado um estudo de casos nas faculdades de medicina da Universidade Eduardo Mondlane, em Moçambique; e da Universidade Federal da Bahia, no Brasil. Foram aplicados 78 questionários e conduzidas 54 entrevistas com informantes chave. Os dados quantitativos foram codificados e organizados usando planilhas do Excel. Todas as entrevistas foram gravadas e transcritas na íntegra. Os dados qualitativos foram submetidos à análise de conteúdo, especificamente à análise temática. A aquisição de competências para atenção primária à SSR na formação médica foi aqui analisada na percepção dos atores sociais das escolas médicas seleccionadas a partir de seis eixos estruturais identificados e considerando três dimensões seleccionadas para compreensão das mudanças ocorridas no campo da SSR: a Teórico-conceptual, Técnico-científica e Ético-sócio-cultural. A análise dos dados recolhidos produziu informações relacionadas às necessidades formativas na área da SSR. Na percepção da maioria dos informantes os currículos das escolas analisadas estão estruturados principalmente para garantir a aquisição de conhecimento biomédico e habilidades clínicas, e a maioria dos estudantes dessas escolas não conseguem adquirir, ao longo do curso de medicina, as competências essenciais para fornecer efectivamente serviços básicos de SSR. O processo de reforma curricular em curso nessas faculdades pretende corrigir essas limitações, mas a sua plena implementação é ainda um desafio.

Este estudo permite concluir que uma escola médica capaz de cumprir com a sua missão de formar profissionais competentes para atender às necessidades básicas de saúde da população tem sido um bem desejado nessas instituições. Entretanto, alcançar esse benefício depende de uma gama de factores e do interesse e envolvimento de múltiplos sujeitos em processos que envolvem várias dimensões. Um factor essencial para o cumprimento desta missão é a possibilidade de a faculdade organizar um currículo numa perspectiva integradora, que incorpore o enfoque ampliado da saúde, substituindo a ênfase nos aspectos biomédicos pela adopção de uma perspectiva de actuação intersectorial, visando à protecção, promoção e recuperação da saúde. Por outro lado, a multiplicidade de aspectos envolvidos na SSR pressupõe a necessidade de abordagens multidisciplinares, com a contribuição de várias áreas do conhecimento, para garantir uma formação médica efectiva nesta área.

Este estudo propõe recomendações para fortalecer o ensino-aprendizagem em SSR que incluem: garantir a qualidade e relevância dos processos

educacionais de acordo com a realidade e situação de saúde da população local; fortalecer a capacidade das escolas em termos de infra-estrutura e recursos humanos e materiais; melhorar as competências do pessoal existente; utilizar cenários de prática e metodologias pedagógicas comprovadamente eficazes; revisar e actualizar os currículos em uma base regular; assegurar que as reformas educacionais sejam relevantes e implementadas de forma gradual com o engajamento de todos os interessados; o suporte necessário e com o devido monitoramento e avaliação; estabelecer um ambiente educativo que promova e premie a excelência educacional a inovação e a qualidade no ensino.

SILVA, Renato Fernandes Pinheiro da (2015) Funcional analysis of genes differentially expressed in salivary glands of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles stephensi* in response to infection by *Plasmodium berghei*. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Celular e Molecular. IHMT. Lisboa.

A malária é uma doença infecciosa devastadora causada por parasitas do género *Plasmodium* transmitida através da picada de mosquitos *Anopheles* infectados. As glândulas salivares são os únicos tecidos do mosquito invadidos por esporozoítos de *Plasmodium*, sendo um ponto-chave para a transmissão do parasita tornando o estudo do sialoma de *Anopheles* altamente relevante. No presente estudo, a sequenciação directa de RNA (RNA-Seq) foi utilizado para comparar a expressão diferencial de genes em glândulas salivares de *Anopheles coluzzii* e *Anopheles stephensi* infectados por *Plasmodium berghei*. Para o *Anopheles coluzzii*, 1578 genes sobreexpressos e 1010 genes subexpressos foram encontrados nos mosquitos infectados quando comparados com os controlos não-infectados, sendo que as classes funcionais de genes metabolismo, imunidade, replicação/transcrição/tradução, proteólise e transporte foram as mais afectadas pela infecção pelo parasita. Os resultados obtidos para *Anopheles stephensi* mostraram 1996 genes sobreexpressos e 540 genes subexpressos sob as mesmas condições sendo metabolismo replicação/transcrição/tradução, função celular e transporte as classes funcionais mais representadas. Os resultados obtidos por RNA-Seq foram validados por quantificação relativa por PCR em tempo real. Com base nas suas funções putativas e nos níveis de expressão, o gene que codifica uma proteína transmembranar, transportadora de glucose, *AGAP007752* de *Anopheles coluzzii* foi seleccionado para análise funcional por RNA de interferência. De igual modo foi seleccionado o gene *ASTE0009391* de *Anopheles stephensi*, também conhecido como *prestin*, que codifica para uma proteína transmembranar, transportadora de solutos. Os resultados demonstraram que o número de esporozoítos foi significativamente reduzido quando o gene *AGAP007752* ($p < 0.01$) foi silenciado mas este resultado não se verificou quando o gene *prestin* foi silenciado. Para a produção de anticorpos monoclonais, utilizou-se como antígeno um péptido correspondente ao maior segmento extracelular da proteína *AGAP007752*. Após fusão celular foram obtidos hidridomas e, posteriormente clones que apresentaram títulos elevados quando comparados com o controlo. A especificidade dos anticorpos foi testada por *Western Blotting*. Realizaram-se ensaios de imunolocalização para

confirmar a localização daquela proteína, nas glândulas salivares. Este é a primeira análise transcritômica de glândulas salivares de anofelinos infectadas por *Plasmodium*, utilizando a técnica de sequenciação directa de RNA (RNA-Seq). Os resultados obtidos foram compilados sobre a forma de catálogo de genes, disponíveis para a comunidade científica, representam um contributo importante para o conhecimento das interações parasita-vector que poderão apoiar novas medidas de controlo da malária, nomeadamente, medidas de bloqueio de transmissão.

COELHO, Anabela Pereira (2014) Análise de uma política pública de saúde: Gestão Integrada da Doença, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.

Resumo: Os sistemas de saúde deparam-se, atualmente, com cenários epidemiológicos caracterizados pelo envelhecimento da população e predomínio de doenças crónicas; com novos paradigmas de garantia da qualidade e da segurança da prestação de cuidados de saúde; com necessidade de controlo dos custos no setor da saúde, obrigando, assim, as organizações a adaptarem-se às crescentes necessidades da população.

O reconhecimento desta realidade mutável, tem levado os governos a definirem políticas orientadas para problemas de saúde específicos e a adotar estratégias de intervenção que privilegiam uma abordagem integrada, com o objetivo de melhorar progressivamente a saúde das populações, a qualidade dos cuidados prestados e a eficiência na utilização de recursos.

Em Portugal, a orientação desses princípios basilares, deram origem a um modelo designado de “Gestão Integrada da Doença”, cujo principal objetivo é promover uma ação concertada de diferentes prestadores de cuidados de saúde, através da mobilização de recursos adequados, que permitam uma melhoria do estado de saúde, da qualidade de vida e do bem-estar global dos doentes. Esta abordagem passa pela colaboração e coordenação dos diferentes níveis de prestação de cuidados, no sentido de oferecerem cuidados integrados de saúde, com qualidade elevada em termos de prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação e acompanhamento.

A primeira patologia a ser considerada neste modelo foi a doença renal crónica, por motivos de oportunidade e de resposta a uma crise política instalada em 2007 entre o Ministério da Saúde e os prestadores privados de hemodiálise.

Neste sentido, a presente tese visa contribuir para o aperfeiçoamento da política pública de saúde de gestão integrada da doença, dirigida à doença renal crónica, através de uma síntese analítica de conhecimento, suportada em quatro estudos.

No primeiro estudo, descreve-se a política de gestão integrada da doença renal crónica, particularizando-se a sua implementação, bem como os resultados monitorizados numa série temporal de três anos.

No segundo estudo, apresenta-se o modelo lógico de análise da gestão integrada da doença, bem como a política que, na sua génese, incorpora a gestão clínica da doença, centrada no doente, com especial enfoque na autogestão e na clarificação das melhores práticas profissionais; a reorganização dos serviços de prestação de cuidados, com a criação de

centros de elevada diferenciação e centros de tratamento, com especiais preocupações de orientação do doente no sistema, para que os cuidados lhe sejam prestados no nível mais adequado; um modelo de financiamento específico, indexado aos resultados, que reflita a adoção das melhores práticas e um sistema de informação que permita a monitorização e avaliação constante deste processo.

No terceiro estudo, através da revisão de literatura sobre a gestão integrada da doença, procura-se identificar o grau de integração de cuidados e as intervenções de gestão de doença predominantes, bem como os resultados observados em doentes. Neste estudo faz-se ainda a contextualização dos resultados obtidos naquilo que é realidade do modelo em Portugal.

No quarto e último estudo, faz-se a contextualização da política de gestão integrada da doença renal crónica procurando-se, através do modelo teórico de *Walt e Gilson*, contribuir para a compreensão do fenómeno político e para o planeamento de novas intervenções.

A presente tese conclui que a implementação da política pública de gestão integrada da doença renal crónica parece revelar-se uma estratégia inovadora como ferramenta de monitorização da prestação de cuidados de saúde, bem como de promoção da efetividade e eficiência.

COSTA, Pedro Nisa (2014) Improved nucleic acid testing strategies to detect and discriminate veterinary relevant *Mycobacterium tuberculosis* complex members, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: Os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) são agentes causadores de tuberculose em humanos e animais. A tuberculose bovina tem sido sujeita nas últimas décadas a programas de erradicação bastante dispendiosos, na maioria dos países desenvolvidos, envolvendo a análise laboratorial de tecidos de animais suspeitos para a detecção dos membros do MTC, nomeadamente *Mycobacterium bovis*. O diagnóstico definitivo é obtido através da cultura bacteriológica, o que pode levar 6-12 semanas, período durante o qual a carcaça do animal suspeito e a exploração de origem permanecem sob embargo sanitário. Neste trabalho, descreve-se um protocolo de extracção de DNA de fácil utilização adaptado aos tecidos, o qual é acoplado a um *semi-nested* PCR em tempo real, utilizando como alvo a IS6110, por forma a melhorar a detecção directa de bactérias pertencentes ao MTC em animais, abreviando o período necessário ao diagnóstico. O ensaio foi avaliado num grupo de 128 amostras de tecido provenientes de bovinos, javalis, veados e raposas. O desempenho global do teste corresponde a uma sensibilidade e especificidade de diagnóstico de 98,2% e 88,7%, respectivamente. Foi observado um coeficiente *kappa* de 0,859 entre o ensaio de *semi-nested* PCR e a cultura bacteriológica. Este ensaio permite a detecção rápida de micobactérias tuberculosas em amostras de animais com alta sensibilidade e especificidade, sendo acessível e de baixo custo para uma utilização num laboratório de diagnóstico veterinário.

As espécies do MTC são geneticamente muito semelhantes, mas podem divergir na sua epidemiologia, nomeadamente na distribuição geográfica e preferência pelo hospedeiro, factores de virulência e padrões de susceptibilidade antimicrobiana. No entanto, o diagnóstico laboratorial

convencional não diferencia rotineiramente as espécies do MTC. Foi desenvolvido um algoritmo de identificação rápido e robusto, baseado em PCR em tempo real, dirigido para cinco alvos genómicos para a identificação das espécies do MTC vulgarmente associadas à tuberculose nos bovinos e outros animais. O primeiro passo permite a confirmação dos membros do MTC nas culturas, através da detecção da IS6110, ou como uma espécie micobacteriana, pela presença do 16S rDNA. Se uma espécie do MTC for identificada, o segundo passo do algoritmo permite avaliar a presença ou ausência das regiões genómicas RD1, RD4 e RD9. O padrão correspondente permite inferir a espécie do isolado como *M. tuberculosis* (se todas as RDs estiverem presentes), *M. caprae* (se apenas a RD1 e RD4 estiverem presentes) ou *M. bovis* (se apenas a RD1 estiver presente). O algoritmo de identificação desenvolvido demonstrou um coeficiente κ de 0,970 com o resultado da análise bacteriológica. O ensaio pode ser implementado em laboratórios de diagnóstico veterinário, especialmente em laboratórios de referência.

Tem-se registado uma procura crescente por métodos de diagnóstico de doenças infecciosas rápidos, de fácil utilização e acessíveis, passíveis de serem utilizados em pontos-de-decisão. A detecção dos membros do MTC é geralmente realizada por diversos métodos convencionais baseados na cultura, que normalmente necessitam de oito semanas. Foram também desenvolvidas estratégias de diagnóstico molecular, mas a maioria requer operadores qualificados e equipamentos e infra-estruturas sofisticadas. Recentemente, a técnica de *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) mostrou-se promissora para o desenvolvimento de testes rápidos, de baixo custo, sensíveis e específicos para a detecção de agentes patogénicos. Neste trabalho, foram optimizados dois sistemas LAMP em formato *duplex* (dLAMP) para a identificação do MTC e *Mycobacterium tuberculosis*, e do MTC e *M. bovis*, apresentando valores de sensibilidade e especificidade comparáveis a outras abordagens em que se utiliza o PCR convencional. Os resultados das amplificações são avaliados colorimetricamente utilizando dispositivos de fluxo lateral, simples e comercialmente disponíveis, para a detecção de ácidos nucleicos (NALF).

Os resultados apresentados nesta dissertação contribuem para a melhoria das estratégias de diagnóstico molecular existentes no combate à tuberculose animal.

COSTA, Sofia Maria Mourão Marques dos Santos (2014) Efflux pump activity in drug resistance of *Staphylococcus aureus*. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: *Staphylococcus aureus* é um importante agente patogénico, para o qual estão descritos vários mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos, sendo a resistência mediada por bombas de efluxo (MDR-EP) o menos bem caracterizado. Foi objectivo desta Dissertação avaliar a contribuição global destes sistemas de efluxo, em particular, de NorA, Smr e QacA, para a resistência a fluoroquinolonas e a outros compostos antimicrobianos em *S. aureus*.

Foi estudada uma colecção de isolados clínicos de *S. aureus* resistentes à ciprofloxacina e estirpes de referência. A actividade de efluxo foi avaliada por metodologias baseadas no transporte de brometo de etídeo (EtBr), substrato

de MDR-EPs, e pela determinação da concentração mínima inibitória para substratos de MDR-EPs na presença/ausência de inibidores de efluxo. A informação obtida foi complementada pela análise por RT-qPCR da expressão de genes que codificam para as principais MDR-EPs de *S. aureus* e seus reguladores e pesquisa de mutações associadas aos principais fenótipos de resistência estudados.

A relevância de NorA para a resistência aos compostos antimicrobianos foi analisada através da resposta de *S. aureus* ao stress imposto pelo EtBr. Demonstrou-se que a presença/ausência deste composto promove o aumento/decrécimo da expressão do gene *norA* com conseqüente redução/aumento da susceptibilidade a fluoroquinolonas, biocidas e corantes. Foram também analisados os alelos de *norA* dos isolados clínicos, tendo sido verificada a predominância do alelo *norAI*. Estes estudos evidenciaram a complexidade da regulação deste sistema, com a identificação de múltiplos factores que contribuem para a modelação da expressão de *norA* e actividade de NorA.

Em relação às bombas codificadas em plasmídeos, verificou-se que tanto QacA, codificada num plasmídeo associado à multirresistência, como Smr, codificada num plasmídeo sem genes de resistência adicionais, desempenham um papel importante na resistência a biocidas, podendo contribuir para a persistência e disseminação em ambiente hospitalar de estirpes resistentes a biocidas e potencialmente resistentes a antibióticos.

A caracterização global dos isolados de *S. aureus* de origem clínica revelou uma contribuição significativa do efluxo para a resistência aos compostos antimicrobianos, com a identificação de um grupo de isolados com actividade de efluxo aumentada e correlacionável com susceptibilidade reduzida a fluoroquinolonas e biocidas. A incubação com inibidores de efluxo, em particular as fenotiazinas, promoveu uma redução dos níveis de resistência, sem contudo resultar na reversão do fenótipo de resistência. Os estudos de expressão génica não revelaram uma correlação directa entre maior actividade de efluxo e expressão génica, sugerindo que os isolados clínicos podem já estar adaptados para uma resposta por efluxo na presença de compostos nocivos. Observou-se ainda uma multiplicidade de respostas mediadas por efluxo aos diferentes substratos e suas concentrações, variáveis no padrão temporal de expressão génica, níveis de expressão e genes envolvidos.

Os resultados obtidos evidenciam que o efluxo constitui parte da resposta inicial da célula aos compostos antimicrobianos, a qual, no caso das fluoroquinolonas, é seguida pela aquisição de mutações nos genes alvo. Mostrou-se ainda que a pressão exercida por biocidas induz a resistência cruzada a fluoroquinolonas.

Em resumo, os resultados descritos nesta Dissertação demonstram a contribuição do efluxo para a emergência de resistência a fluoroquinolonas e outros compostos antimicrobianos e o seu papel na emergência de estirpes de *S. aureus* multirresistentes em ambiente hospitalar.

MACHADO, Diana Isabel Oliveira (2014) The dynamics of drug resistance in Mycobacterium Tuberculosis: exploring the biological basis of multi - and extensively drug resistant tuberculosis (MDR/XDRTB) as a route for alternative therapeutic strategies. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: Estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* multi- e extensivamente resistentes, constituem uma ameaça para a saúde humana. O principal objectivo desta Tese foi estudar os fenómenos subjacentes ao desenvolvimento da resistência em *M. tuberculosis*, de modo a ser possível desenvolver estratégias para reduzir o seu desenvolvimento.

Iniciamos o estudo com a descrição da base molecular da resistência aos antibacilares em estirpes clínicas de *M. tuberculosis* circulantes em Lisboa, através da determinação dos seus padrões de resistência e sua correlação com as mutações associadas à resistência. Os resultados mostraram uma clara correlação entre a presença de uma mutação e o fenótipo de resistência. A descrição dos perfis de resistência de estirpes resistentes aos antibacilares adiciona nova informação para o desenvolvimento de metodologias mais eficazes para o diagnóstico e tratamento da tuberculose.

De seguida, avaliamos a contribuição dos sistemas de efluxo para o desenvolvimento da resistência aos antibacilares em *M. tuberculosis*. O estudo baseou-se na indução *in vitro* de um fenótipo de resistência à isoniazida por exposição prolongada de estirpes de *M. tuberculosis* à concentração crítica de isoniazida. Os resultados mostraram que o aumento da actividade de bombas de efluxo permite a manutenção de uma população resistente num doente em tratamento, da qual irão emergir mutantes geneticamente resistentes. A utilização de compostos inibidores de efluxo demonstrou ser capaz de reduzir este nível de resistência. Por último estudamos o mecanismo de acção dos compostos inibidores do efluxo, que partilham a característica comum de serem inibidores de canais iónicos, verapamil, tioridazina, clorpromazina, flupentixol e haloperidol, quer *in vitro* quer *ex vivo*. Todos os compostos apresentaram actividade sinérgica inibitória em combinação com os principais antibacilares de primeira linha e foram capazes de inibir o efluxo activo demonstrando o seu papel como inibidores de efluxo. Igualmente demonstraram potente actividade bactericida que pôde ser correlacionada com a diminuição nos níveis de ATP intracelulares. Foi também detectada sobreexpressão de genes de efluxo em resposta à exposição aos antibióticos *in vitro* e *ex vivo*, indicando que a resistência aos antibióticos em macrófagos é também mediada pela sobreexpressão de bombas de efluxo, a qual pode ser inibida por inibidores de efluxo. Os compostos estudados potenciaram a actividade antimicrobiana de macrófagos infectados e induziram a acidificação do fagolisossoma, com consequente expressão de hidrolases lisossomais. Com estes resultados, foi possível propor, como mecanismo de acção para estes compostos, a inibição da cadeia respiratória micobacteriana. Esta inibição leva à dissipação do potencial de membrana, depleção de ATP, a produção de radicais de oxigénio e morte celular. Por outro lado, e em simultâneo, a disrupção da força motriz protónica (PMF) resulta na inibição dos sistemas de efluxo que dela dependem, promovendo assim a retenção dos antibióticos sujeitos a efluxo activo. No que se refere a célula hospedeira, a acidificação fagossomal estimulada por estes compostos actua em sinergismo com vários componentes da resposta imunitária do hospedeiro, restringindo assim o crescimento intracelular de *M.*

tuberculosis. No contexto geral, demonstramos que estes compostos possuem dupla acção, uma vez que actuam quer na bactéria quer na célula hospedeira. Este trabalho contribuiu para o aumento do conhecimento sobre a resistência aos antibióticos em *M. tuberculosis*. O estudo do mecanismo de acção destes compostos poderá contribuir para o desenvolvimento de novos compostos e pode servir de base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para combater a tuberculose e em particular as suas formas multirresistentes.

MENDES, Cristina Isabel (2014) Population diversity and transmission dynamics of Plasmodium sp.. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: Apesar dos esforços desenvolvidos nas últimas décadas, a malária continua a ser um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo a principal causa de morbilidade e mortalidade principalmente na África Subsaariana.

Fazer uma análise global, que integre todos os intervenientes deste sistema complexo, que engloba três entidades biológicas, fatores socioeconómicos e ambientais, não é fácil, mas pensamos ser um ponto fulcral para um maior conhecimento sobre esta doença. Neste estudo, utilizando um conjunto completo de amostras – sangue periférico e mosquitos – pretendeu-se analisar este complexo sistema de forma abrangente.

Deste modo, este trabalho teve como principais objetivos: 1) Caracterizar as populações parasitárias circulantes nos dois hospedeiros – humano e mosquito vetor - através da identificação das espécies de *Plasmodium* presentes; marcadores moleculares de diversidade (*Pfmsp2*) e marcadores moleculares associados a resistência a fármacos (mutações pontuais nos genes *Pfdhps*, *Pfdhfr*, *Pfcr1* e *Pfmdr1*); 2) Analisar as pressões seletivas atuantes sobre os genes associados a resistência a fármacos e 3) Analisar a diversidade de genes do mosquito vetor - *AgTG1* e *AgTG2* - tentando relacioná-los com a presença/ausência de infeção.

As amostras biológicas utilizadas para este trabalho foram recolhidas em três países diferentes: na Guiné Equatorial continental foram colhidas amostras de sangue e mosquitos adultos em duas localidades, Miyobo e Ngonamanga. Em Angola obtiveram-se as amostras de sangue em quatro localidades diferentes (Gabela, Porto Amboim, Kissala – Sumbe e Praia – Sumbe) e foram ainda usados neste estudo mosquitos adultos provenientes de Antula, Guiné-Bissau.

Em relação ao primeiro e segundo objetivos deste trabalho, foi possível constatar a presença das quatro espécies de *Plasmodium* em ambos os hospedeiros, com prevalências superiores às reportadas oficialmente, incluindo *P. vivax*, espécie que ainda não tinha sido detetada na Guiné Equatorial continental. Detetou-se igualmente indivíduos Duffy negativos infetados com duas estirpes diferentes de *Plasmodium vivax* (*P. vivax* clássico e o *P. vivax* VK247). Relativamente às mutações pontuais associadas à resistência aos antimaláricos, constatou-se que de um modo geral estas ocorriam em elevada prevalência. Verificou-se igualmente que a resistência à pirimetamina encontrasse bem estabelecida neste país, enquanto a resistência à sulfadoxina terá tido uma introdução mais recente. Relativamente ao terceiro e último objetivo deste trabalho, constatou-se que os dois genes estudados - *AgTG1* e

AgTG2- apresentam fortes sinais de seleção positiva, podendo estar envolvidos no reconhecimento de organismos patogénicos, e por conseguinte envolvidos numa resposta contra a infeção.

Por fim, este trabalho permitiu concluir que na Guiné Equatorial continental existem as quatro espécies de *Plasmodium*, incluindo a espécie *P. vivax* que até à data não estava descrita no país. Foi encontrada uma elevada prevalência de mutações associadas à resistência à sulfadoxina-pirimetamina, pelo que se recomenda uma contínua monitorização destas mutações. Por fim constatou-se que os genes *AgTG1* e *AgTG2* apresentam fortes sinais de seleção positiva, podendo estar envolvidos na resposta à infeção por *Plasmodium*.

NETO, Zoraima Naymbi da Silva (2014) - Biological characterization of de ubiquitylating enzymes (UBPs/UCHs) in Plasmodium spp as potential drug targets Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

A malária ainda constitui um grande problema de saúde pública e a resistência aos antimaláricos ameaça todos os esforços efectuados com vista ao combate e controle desta doença. Existe uma grande necessidade de se identificar novos compostos de preferência que actuem em novos alvos terapêuticos. A via da ubiquitinação/proteosoma já foi identificada como um alvo terapêutico interessante. Mutações nas enzimas de des-ubiquitilação (DUBs) que catalizam a remoção da ubiquitina estão associadas ao desenvolvimento de doenças infecciosas e não infecciosas.

Neste projecto quatro DUBs foram identificadas no genoma do parasita *Plasmodium falciparum* e foram caracterizadas. A expressão dos genes que codificam estas enzimas ao longo do ciclo de vida do parasita na presença e ausência de fármaco foi efectuada por RT-PCR. Anticorpos policlonais obtidos a partir de ratinhos foram utilizados para a deteção da abundância das proteínas ao longo do ciclo de vida do parasita. Utilizou-se ainda a técnica de transfeção com o objectivo de criar uma linha knockout para determinar se estas proteínas são essenciais para o parasita. Proteínas recombinantes foram expressas em células de *E.coli* e actividade enzimática das mesmas foi testada usando um substrato específico para as DUBs. O inibidor das DUBs com actividade antimalárica, curcumina foi usado quer *in vitro* para testar a sua actividade sobre as proteínas recombinantes, mas também *in vivo* no modelo de malária roedora de *Plasmodium chabaudi* em associação com cloroquina e artemisinina. Um ensaio de proteómica foi também usado para ver que proteínas estão alteradas em resposta ao tratamento com curcumina.

Os resultados demonstram que em *P. falciparum* os genes *pfuch-11*, *pfuch-13*, *pfuch-154* e *pfubp-8* são diferencialmente expressos ao longo do ciclo de vida do parasita e as respectivas proteínas são mais abundantes no estadio de trofozoito e esquizonte. O tratamento dos parasitas com artemisinina, cloroquina, curcumina induziu um aumento temporário na expressão dos genes seguido de um declínio. Não foi possível obter uma linha parasitária knockout *pfuch-11* e *pfuch-13* viável. As proteínas recombinantes foram expressas com sucesso em células de *E. coli* excepto a *Pfuch-154*. As *Pfuch-11*, *Pfuch-13*, *Pfubp-8* demonstraram actividade enzimática e interagiram com o substrato Ub-AMC. Os IC50 da curcumina nas proteínas recombinantes foram: *Pfuch-11* 15µM, *Pfuch-13* 25.4µM, *Pfubp-8* 10µM e para a proteína recombinante humana USP2, 5µM. A Curcumina quando testada nas células HepG2 apresenta alguma toxicidade *in vitro*, mas não apresenta uma alta toxicidade em ratinhos e quando utilizada em associação com a cloroquina apresenta um efeito de sinergismo. Enquanto a

associação da curcumina com artemisinina o resultado é antagónico. Os ensaios de proteômica em culturas de *P. falciparum* tratadas com curcumina revelaram 10 proteínas que se encontraram alteradas em resposta ao tratamento. Estas proteínas estão envolvidas no metabolismo do sulfato, tradução e degradação de proteínas, ciclo celular e organização celular.

Em conclusão, este trabalho demonstra que estas enzimas são potenciais alvos terapêuticos, mas será necessário mais estudos moleculares, bioquímicos e farmacológicos para aumentar a selectividade dos inibidores das DUBs para as enzimas do parasita e minimizar os danos nas proteínas do hospedeiro humano.

ROCHA, Diara Kady Monteiro Vieira Lopes (2014) Plantas medicinais tropicais e mediterrânicas com propriedades biocidas no controlo de insetos vetores de agentes patogénicos. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: As parasitoses e as arboviroses têm um impacto social e económico considerável, em particular nos países tropicais e subtropicais. Problemas financeiros e de gestão, assim como as alterações ambientais, a resistência dos vetores aos inseticidas e dos agentes patogénicos aos fármacos, o aumento e respetiva mobilidade da população humana contribuíram não só para o incremento da prevalência de doenças transmitidas por vetores, como também para a sua emergência ou reemergência em novas regiões.

O progressivo aumento de resistências nos insetos vetores tem levado à restrição progressiva da aplicação de inseticidas químicos e/ou à introdução de novos compostos sintéticos.

O presente estudo surgiu da necessidade de desenvolver novas medidas de controlo vetorial, mais seguras para o ambiente, e consistiu na avaliação das propriedades biocidas de plantas medicinais tropicais e mediterrânicas, (*Sambucus nigra*, *Melia azedarach*, *Azadirachta indica*, *Foeniculum vulgare* e *Mentha pulegium*), bem como na avaliação da sua utilidade no controlo dos culicídeos vetores de agentes patogénicos da malária e arboviroses, nomeadamente, *Anopheles arabiensis* e *Aedes aegypti*, em Cabo Verde.

Este trabalho englobou um conjunto de ações, nomeadamente a colheita, o processamento e o rastreio sobre alvos biológicos, de extratos vegetais e óleos essenciais (OE). Foram realizados extratos brutos de folhas de *S. nigra*, *M. azedarach* e *A. indica* com solventes de diferentes polaridades. Estes extratos foram posteriormente analisados por Cromatografia em Camada Fina e fracionados por Cromatografia em Coluna. Os OEs de *M. pulegium* e de *F. vulgare*, obtidos por hidrodestilação das partes aéreas ou por via comercial foram caracterizados qualitativamente e quantitativamente por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa e confirmada a identificação dos seus constituintes por Ressonância Magnética Nuclear.

Os bioensaios inseticidas foram efetuados de acordo com os testes padronizados da Organização Mundial de Saúde. Os resultados foram analisados estatisticamente com recurso aos programas Microsoft Excel® 2010 e SPSS® para Windows e aos testes estatísticos considerados relevantes.

Quanto às três primeiras plantas referidas apenas o extrato de *S. nigra* revelou atividade em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*. Estas são também mais suscetíveis ao OE de *F. vulgare* (amostras de Cabo Verde e Portugal respetivamente CL50= 23,3 e 28,2 µL⁻¹) comparativamente ao óleo de *M.*

pulegium (amostras de Cabo Verde e Portugal respetivamente CL50= 136,1 e 107,3 μL^{-1}). Embora não se tenham registado diferenças altamente significativas entre as plantas em estudo, é de salientar que as concentrações necessárias para eliminar 50, 90 e 99% da população são menores quando se aplica o OE de *F. vulgare*. Quanto ao *An. arabiensis* optou-se por avaliar apenas o OE de *F. vulgare*, não tendo sido observadas diferenças significativas comparativamente a *Ae. aegypti*. Os resultados de bioensaios com os compostos ativos de ambas as espécies vegetais evidenciaram a existência de efeitos sinérgicos. Os adultos demonstraram maior sensibilidade ao OE de *F. vulgare* de Cabo Verde. Este estudo permitiu uma caracterização química e avaliação de atividade de plantas de regiões geográficas que ainda não tinham sido estudadas com resultados bastante promissores.

SIMÕES, Maria Luísa (2014) - Hemozoin as an immune stimulant of the mosquito *Anopheles gambiae* response against the malaria parasite. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Celular e Molecular. IHMT. Lisboa.

Resumo: Hemozoína, um metabolito produzido por *Plasmodium* spp., tem surgido como um potente estimulador, activando o sistema imunitário do hospedeiro e levando à produção de citocinas e quimiocinas em tecidos de mamíferos. Neste estudo, desvendamos o papel deste subproduto do parasita como estimulador da imunidade de *Anopheles gambiae* em resposta à infecção por *Plasmodium berghei*. A malária é uma doença infecciosa de distribuição mundial, causada por parasitas do género *Plasmodium* e transmitida pelas fêmeas de mosquitos do género *Anopheles*. A resposta imunitária do mosquito vector da malária contra o parasita envolve várias vias metabólicas que não se encontram ainda bem caracterizadas. Resultados laboratoriais revelaram que a hemozoína activa a expressão de vários genes da imunidade, incluindo péptidos anti-microbianos e factores anti-*Plasmodium*. Destaca-se a indução, após estimulação com hemozoína, da forma larga (REL2-F) do factor de transcrição REL2, da via *Immune deficiency* (Imd). Estes resultados foram confirmados pela estimulação de tecidos e células de *Anopheles gambiae* com hemozoína sintética e silenciamento do gene que codifica REL2-F e do gene que codifica o seu regulador negativo Caspar. Neste trabalho, mostrou-se pela primeira vez o impacto do tratamento com hemozoína na infecção por *Plasmodium*: a hemozoína reduz eficientemente tanto a taxa como a intensidade da infecção no mosquito. Propomos, assim, que a hemozoína estimula a imunidade inata de *Anopheles*, activando a expressão de genes efectores que tornam o mosquito mais resistente ao *Plasmodium*, e que esta activação é mediada por REL2.

Após identificação de um conjunto de genes associados à imunidade induzidos pela hemozoína, e de acordo com as propriedades da via Imd/REL2 sugeridas pelos resultados obtidos, construímos uma linha de mosquitos *Anopheles gambiae* geneticamente modificados, através da sobreexpressão do gene anti-plasmódico *FBN9* (*fibrinogen immunolectin 9*), sob regulação de *Vitellogenin 1*, um promotor específico do corpo gordo.

TEMIDO, Marta (2014) - Exequibilidade de uma revisão da combinação de papéis profissionais entre médicos e enfermeiros em Portugal. Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.

Resumo: A força de trabalho presente no sistema de saúde português indicia uma combinação ineficiente de recursos médicos e de enfermagem. Contudo, tal pode não ser suficiente para que seja possível modificar o *skill mix* disponível, expandindo o âmbito de exercício da profissão de enfermagem, na medida em que se reconhece que a exequibilidade de uma política depende de vários fatores de contexto que não se restringem à sua intrínseca validade técnica.

Entre esses fatores incluem-se a aceitabilidade social, a viabilidade legal, o processo político e as preferências dos profissionais de saúde, analisados nesta investigação com base em métodos mistos.

A pesquisa revelou que: i) em termos de aceitabilidade social, apesar de não existir consenso suficiente sobre se uma opção deste tipo é adequada ao contexto português, algumas áreas assistenciais, como os cuidados de saúde primários, indiciam um maior potencial de acolhimento; ii) em termos de exequibilidade legal, salvo nos atos de reserva médica absoluta, há espaço normativo para uma redistribuição do trabalho entre médicos e enfermeiros, na medida em que muitos atos são considerados exclusivos da área médica por força de práticas instituídas; iii) em termos de processo político, embora as iniciativas identificadas no estudo de caso não sejam diretamente transponíveis, uma liderança forte da estratégia, uma compreensão clara dos objetivos a alcançar e uma visão de longo prazo para o sistema de saúde surgem como elementos críticos do sucesso; iv) em termos de preferências dos profissionais de saúde de cuidados primários, enquanto algumas equipas de saúde familiar se distanciam da adequação da opção ao contexto português, outras percecionam as necessidades assistenciais não satisfeitas como justificativas da atribuição de papéis clínicos mais vastos à enfermagem, o que mostra diferentes disponibilidades para o reforço de modelos colaborativos de cuidados.

Apesar das suas limitações – sobretudo das que resultam de nem sempre se ter conseguido a colaboração necessária para compreender totalmente a aceitabilidade social e as preferências dos profissionais de saúde – a investigação permitiu concluir que, em Portugal, existe um relativo espaço social, normativo, político e nas preferências dos profissionais de saúde para a expansão do campo de exercício da profissão da enfermagem.

Tal como diferentes países se encontram em diferentes estádios de discussão deste processo, também no nosso país diferentes *stakeholders*, diferentes campos de atividades e diferentes equipas de saúde revelam distinto potencial de adesão a esta inovação, sugerindo-se que a estratégia mais adequada implica a aceitação de diferentes formas de distribuição do trabalho, da iniciativa das equipas profissionais, sem prejuízo da necessidade de definição de um enquadramento adequado a prevenir a degradação da qualidade e segurança dos cuidados.

Em qualquer circunstância, não poderá esquecer-se que otimizar o *skill mix* da força de trabalho em saúde é um processo dinâmico e que o desafio que se coloca ao sistema de saúde português reside no desenvolvimento de uma

estratégia global de otimização sistemática, alicerçada num modelo educativo que incentive a maximização das competências individuais e da equipa e estimule o papel dos cidadãos, saudáveis e doentes, como co-produtores da saúde.

ALVES, Carolina Alpalhão Mantero de Mendonça (2013) - Characterization of the-hepatitis delta virus small antigen: intracellular localization, structure, multimerization and RNA binding Ability. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular e Celular. IHMT. Lisboa.

Resumo: O vírus da hepatite delta (HDV) é o agente patogénico responsável por uma das formas mais severas de hepatite viral. O genoma consiste numa molécula circular de RNA de cadeia simples de polaridade negativa e apresenta uma única proteína viral, o antígeno delta pequeno (S-HDAg). Na sequência de um mecanismo de *editing* outra proteína viral é traduzida, o antígeno delta grande (L-HDAg). Apesar de partilharem grande parte da sua sequência, as duas proteínas desempenham funções distintas. O S-HDAg é essencial para a acumulação de RNAs virais enquanto o L-HDAg inibe a replicação viral e é necessário para o empacotamento. O HDV depende extensivamente de factores do hospedeiro para completar o seu ciclo de replicação. Pensa-se que a polymerase II (pol II) do hospedeiro é redireccionada para transcrever o RNA viral.

No presente trabalho procurou-se caracterizar o S-HDAg e clarificar o seu papel no ciclo de replicação do HDV.

Observamos que quando o S-HDAg é expresso na presença de replicação do RNA viral, o antígeno co-localiza com a pol II. Contudo, a co-localização com pol II verifica-se mesmo na presença de RNA viral incapaz de ser replicado e na ocorrência de inibição da replicação viral, sugerindo que o S-HDAg não participa directamente na transcrição do RNA viral. Assim, propomos que o S-HDAg é essencial para acumulação de RNAs virais protegendo ou estabilizando os RNAs. Observamos ainda que na ausência de RNA viral o S-HDAg co-localiza com a nucleolina nos nucléolos. Contudo, na presença de RNA incapaz de ser replicado, o antígeno desloca-se para o nucleoplasma mantendo-se a nucleolina nos nucléolos, sugerindo que o S-HDAg não interage directamente com a nucleolina.

Ao estudarmos as características estruturais do S-HDAg verificámos, utilizando um preditor de desordem intrínseca, que apresenta um elevado grau de desordem. A previsão foi confirmada *in vitro* por dicroísmo circular observando-se que apenas 30% dos amino ácidos adoptam uma conformação de hélice α . A ausência de uma estrutura rígida pode conferir ao antígeno flexibilidade para se adaptar a diferentes parceiros e participar em vários passos do ciclo de replicação viral.

A multimerização do S-HDAg foi analisada por dispersão de luz dinâmica. Os resultados indicam que o antígeno recombinante purificado é capaz de formar multímeros de 12 moléculas. Adicionalmente, foram observados multímeros de seis a oito moléculas em gel de poliacrilamida desnaturante, após *cross-linking*.

Os mesmos multímeros foram observados para S-HDAg presente em partículas virais sugerindo que a multimerização do antigénio ocorre *in vivo*. Finalmente, estudamos a capacidade do S-HDAg interagir com ácidos nucleicos. Verificamos que multímeros e monómeros de S-HDAg são capazes de interagir *in vitro* com RNA e DNA. A falta de especificidade observada pode dever-se apenas a interações electrostáticas entre o S-HDAg de carga positiva (+12) e ácidos nucleicos de carga negativa. Propomos que, *in vivo*, a fosforilação extensiva do S-HDAg reduza a carga positiva contribuindo para que a interacção seja específica para os RNAs virais.

ANTUNES, Sandra Isabel da Conceição (2013) Differential expression and functional characterization of cattle tick genes in response to pathogen infection (*Babesia bigemina*), Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: O conceito “*One health*” reconhece a necessidade do trabalho conjunto de veterinários, profissionais de saúde e cientistas, dada a interface dinâmica entre pessoas, animais e ambiente. Este conceito é muito importante em zoonoses, tais como doenças associadas a carraças (DAC’s) que dependem de animais como reservatório. Os protozoários do género *Babesia* são agentes patogénicos transmitidos por carraças que causam a doença denominada babesiose num variado número de animais incluindo o Homem. Particularmente a *B. bovis* e *B. bigemina* são transmitidas por carraças, relacionadas com gado, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* e *R. microplus* sendo estas consideradas os ectoparasitas de maior importância, com largo impacto económico na produção animal. O uso tradicional de acaricidas no controlo de carraças apresenta diversas desvantagens incluindo a seleção de carraças acaricido-resistentes e contaminação ambiental com resíduos químicos. As vacinas destacam-se como uma alternativa ao uso de acaricidas. O objetivo destas vacinas é a proteção contra DAC’s através do controlo das infestações pelos vectores e redução de transmissão de doença. As proteínas envolvidas nas interações carraça-agente patogénico podem ser bons candidatos para essas novas vacinas mas a sua identificação e validação continuam a ser obstáculos. Os objetivos do presente estudo foram, primeiro, a identificação de genes de *R. annulatus* diferenciadamente expressos em resposta à infeção por *B. bigemina*, segundo, a validação da influência destes genes no processo de infeção e finalmente a caracterização dos antigénios identificados, a fim de selecionar os melhores candidatos, para o desenvolvimento de uma potencial nova vacina. A fim de alcançar os objectivos propostos, clones de uma biblioteca de hibridização subtrativa por supressão (SSH) foram sequenciados e analisados. Os genes diferenciadamente expressos com prováveis funções relacionadas com a interface carraça- agente patogénico, foram selecionadas para validação dos resultados de SSH por real time RT-PCR. A análise funcional conduzida por RNA de interferência mostra que, nas condições do presente estudo, o silenciamento dos genes que codificam para as proteínas, sérica amiloide A e TROSPA levam á redução de níveis de infecção em *R. annulatus* e em *R. microplus* em comparação com o grupo controlo. Em *R. microplus* é demonstrada a influência também da calreticulina (CRT). As proteínas TROSPA e CRT foram selecionadas e obtidas usando um sistema de expressão em *Escherichia coli* e anticorpos

poli/monoclonais foram produzidos. O reconhecimento das proteínas nativas foi confirmado por Western blotting e imunofluorescência em tecidos de carraça. O efeito dos anticorpos específicos, suplementados à refeição de sangue, foi demonstrado pela avaliação do peso final e/ou ovoposição em carraças alimentadas artificialmente. Não foi observado efeito significativo na aquisição de *B. bigemina*. Os resultados mostram as vantagens e desvantagens do sistema *in vitro* de alimentação artificial de carraças por tubos capilares na caracterização de antigénios protetores de carraça. Diferentes estudos caracterizaram a interface carraça- agente patogénico a nível molecular no entanto, o presente estudo apresenta a primeira análise funcional de genes em carraças infectadas com *B. bigemina*. Os resultados apresentados contribuem para um maior conhecimento do papel de genes de carraça no processo de infeção/multiplicação por *Babesia* sp., bem como para o desenvolvimento de novas vacinas.

COSTA, Cristina Isabel Correia de Almeida (2013) Generation and characterisation of monoclonal antibodies against cell cycle and cytokinesis regulators in *Trypanosoma brucei*, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: *Trypanosoma brucei* é o parasita que causa Trypanossomose Africana, sendo transmitido pela picada de um inseto vetor para a corrente sanguínea do hospedeiro mamífero. Afeta atualmente 36 países subsaarianos e a falta de métodos de diagnóstico eficazes e de tratamentos seguros e eficazes, levou à necessidade de se desenvolverem novas medidas de controlo e novas estratégias terapêuticas.

O ciclo celular do parasita *T. brucei* é invulgar. Uma vez que é tão distinto do ciclo celular dos mamíferos, as proteínas que o regulam têm sido consideradas como possíveis alvos terapêuticos. No entanto, muitas proteínas reguladoras ainda não foram identificadas e a função específica de algumas proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular é desconhecida. De entre os diversos reguladores do ciclo celular, estão as CRKs e as ciclinas que as ativam. Em *T. brucei*, foram identificadas 11 CRKs (CRK1-4 and CRK6-12) e 10 ciclinas. No entanto, ainda nem todas têm uma função conhecida e apenas dois complexos CRK:ciclina foram identificados *in vivo*. Durante este projeto, provou-se a existência de um novo complexo: CRK12:CYC9, que interage *in vivo* tanto na forma sanguínea como na forma procíclica. Um resultado interessante é que, apesar de interagirem, cada proteína regula diferentes processos biológicos na forma sanguínea do parasita. Na realidade, enquanto a CYC9 está envolvida na regulação do ciclo celular, levando a um bloqueio da citocinese em células em que não é expressa, a cinase CRK12 assume um papel essencial na regulação da endocitose. Esta consiste na primeira vez que uma CRK foi relacionada com o processo de endocitose de *T. brucei*, levando na sua ausência a um alargamento da bolsa flagelar. De forma a garantir estas diferentes funções, tanto a cinase CRK12 como a ciclina 9 podem interagir com outras proteínas, ou ser substituídas funcionalmente por outras cinases/ciclinas.

O uso de anticorpos monoclonais e ensaios de proteção têm sido estudados frequentemente como alternativas terapêuticas. Com esse objetivo, anticorpos monoclonais foram produzidos contra CRK12. Apesar de se ter produzido um

anticorpo que reconhece especificamente esta cinase em diferentes extratos celulares de *T. brucei*, não foi possível usar o mesmo em estudos de localização por fluorescência e os ensaios de neutralização/proteção não foram feitos devido a limitações de tempo.

Um projeto alternativo desenvolvido tinha como objetivo identificar possíveis proteínas reguladoras. Como tal, extratos de citoesqueleto foram obtidos em células sincronizadas em mitose e citocinese, e usados para geração de anticorpos monoclonais. Um total de 28 anticorpos foram selecionados. Apesar de não mostrarem especificidade contra uma fase específica do ciclo celular, produziram-se anticorpos com imunolocalizações muito interessantes. Além disso, estes anticorpos poderiam num futuro ser usados como ferramentas valiosas para estudar diferentes processos biológicas em *T. brucei*.

MACHADO, Patrícia Isabel Pires (2013) Pyruvate kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiencies and their association with malaria: population genetics and proteomic studies, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: A malária é reconhecida como uma das principais forças selectivas a actuar na história recente no genoma humano. Inúmeros polimorfismos genéticos têm sido descritos como protectores contra a gravidade da malária, como o alelo HbS (designado de traço falciforme) e o alelo G6PD A- (associado à deficiência de G6PD). Mais recentemente, também a deficiência de PK foi associada com a protecção contra a malária. Evidências desta associação foram obtidas em estudos com modelos de roedor e estudos *in vitro* utilizando GV humanos deficientes em PK. Até à data, não foram obtidos dados em populações humanas que revelem esta associação: ainda não foi identificada uma variante de PK com uma prevalência elevada em regiões endémicas de malária e não foram identificadas marcas de selecção na região do gene que codifica para a PK (gene *PKLR*). Além disso, os mecanismos subjacentes à protecção contra a malária por deficiências enzimáticas dos GV não estão bem esclarecidos.

Assim, os objectivos do presente estudo foram: investigar os polimorfismos genéticos humanos com associação com a malária em Cabo Verde; pesquisar marcas de selecção da malária na região do gene *PKLR* em populações Africanas; determinar a frequência da deficiência em PK e identificar uma eventual variante da enzima que possa estar sob selecção positiva em regiões endémicas de malária; avaliar o efeito das duas deficiências enzimáticas (PK e G6PD) na invasão e maturação do parasita em culturas *in vitro* de *Plasmodium* usando GV normais e deficientes; e analisar o perfil proteómico de GV infectados e não infectados, normais e com deficiência (em PK e G6PD), bem como de parasitas isolados de GV tanto deficientes como normais.

Em Cabo Verde (área epidémica), não foram identificadas marcas de selecção pela malária, através da análise dos vários polimorfismos. No entanto, quando a análise foi realizada em dois países endémicos (Angola e Moçambique), foram detectadas várias marcas de selecção: a genotipagem de microsatélites (STRs) e polimorfismos de base única (SNPs) localizados na vizinhança do gene *PKLR* revelou uma diferenciação consideravelmente maior entre as

populações Africana e Europeia (Portuguesa), do que a diferenciação determinada aquando da utilização de marcadores genéticos neutros.

Além disso, uma região genómica de maior amplitude apresentou um Desequilíbrio de Ligação (LD) significativo no grupo de malária não grave (e não no grupo de malária grave), sugerindo que a malária poderá estar a exercer pressão selectiva sobre a região do genoma humano que envolve o gene *PKLR*.

No estudo que incidiu na determinação da prevalência da deficiência de PK no continente Africano (realizado em Moçambique), esta revelou-se elevada - 4,1% - sendo o valor mais elevado descrito até ao momento a nível mundial para esta enzimopatia. Na pesquisa de mutações que pudessem estar na causa deste fenótipo (baixa actividade de PK), foi identificada uma mutação não sinónima 829G>A (277Glu>Lys), significativamente associada à baixa actividade enzimática. Esta mutação foi também identificada em Angola, São Tomé e Príncipe e Guiné Equatorial, onde a frequência de portadores heterozigóticos foi entre 2,6 e 6,7% (valores que se encontram entre os mais elevados descritos globalmente para mutações associadas à deficiência em PK). Não foi possível concluir acerca da associação entre a deficiência de PK e o grau de severidade da malária e da associação entre o alelo 829A e a mesma, devido ao baixo número de amostras.

Os resultados dos ensaios de invasão/maturação do parasita sugeriram que, nos GV com deficiência de PK ou G6PD, a invasão (onde está envolvida a membrana do GV hospedeiro e o complexo apical do parasita) é mais relevante para a eventual protecção contra a malária do que a maturação. Os resultados da análise proteómica revelaram respostas diferentes por parte do parasita nas duas condições de crescimento (GV com deficiência de PK e GV com deficiência de G6PD). Esta resposta parece ser proporcional à gravidade da deficiência enzimática. Nos parasitas que cresceram em GV deficientes em G6PD (provenientes de um indivíduo assintomático), a principal alteração observada (relativamente às condições normais) foi o aumento do número de proteínas de choque térmico e chaperones, mostrando que os parasitas responderam às condições de stress oxidativo, aumentando a expressão de moléculas de protecção. Nos parasitas que cresceram em condições de *deficit* de PK (GV de indivíduo com crises hemolíticas regulares, dependente de transfusões sanguíneas), houve alteração da expressão de um maior número de proteínas (relativamente ao observado em condições normais), em que a maioria apresentou uma repressão da expressão. Os processos biológicos mais representados nesta resposta do parasita foram a digestão da hemoglobina e a troca de proteínas entre hospedeiro e parasita/remodelação da superfície do GV. Além disso, uma elevada percentagem destas proteínas com expressão alterada está relacionada com as fendas de Maurer, que desempenham um papel importante na patologia da infecção malárica. É colocada a hipótese de que a protecção contra a malária em GV deficientes em PK está relacionada com o processo de remodelação da membrana dos GV pelo parasita, o que pode condicionar a invasão por novos parasitas e a própria virulência da malária. Os resultados da análise do proteoma dos GV contribuirão para confirmar esta hipótese.

SILVA, Bruno Gomes da Silva (2013) Genetic studies on the mosquito vector *Culex pipiens*, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: As duas espécies do complexo *Culex pipiens* com maior distribuição geográfica, *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens sensu stricto*, são importantes vectores de filárias e arbovírus. *Culex pipiens* s.s. apresenta categorias intra-específicas definidas por características ecológicas e fisiológicas, das quais as formas *pipiens* e *molestus* têm sido implicadas na transmissão do vírus da Febre do Nilo Ocidental na Europa e América do Norte.

Hibridação entre *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. pipiens* s.s. foi documentada em algumas regiões geográficas onde ambas espécies coexistem simpatricamente. Este fenómeno também foi descrito entre as formas *molestus* e *pipiens*, em áreas de simpatria e quando existe contacto limitado em certas épocas do ano. No entanto, o impacto da hibridação na divergência genética entre as espécies ou formas está por clarificar. Além disso, a hibridação pode afectar características ecológicas/fisiológicas das espécies/formas, que podem influenciar a sua capacidade vectorial. Neste contexto, foram analisadas populações do complexo *Cx. pipiens* da Europa, EUA e da Macaronésia com objectivo de determinar níveis de diferenciação genética e taxas de hibridação entre os membros do complexo.

As amostras de mosquitos foram obtidas por diferentes métodos de colheita no terreno e a partir de colónias laboratoriais, entre 2005 e 2011. As análises genéticas realizadas foram baseadas em microssatélites e por polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados. Foram efectuadas comparações abordando questões específicas a diferentes níveis taxonómicos, que estão descritas nos cinco capítulos de resultados da tese.

A distribuição e níveis de hibridação entre *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. Pipiens* s.s. foram avaliados nas ilhas da Macaronésia, o que permitiu detectar híbridos (~40%) em duas ilhas do arquipélago de Cabo Verde. A distribuição destas espécies na região reflecte a biogeografia e aspectos históricos da colonização humana.

A coexistência em habitats de superfície das formas *molestus* e *pipiens* na região da Comporta (Portugal), foi demonstrada pela combinação de análises fenotípicas e genéticas. As análises moleculares também sugerem a existência de um padrão de introgressão assimétrica, de *molestus* para *pipiens*. Estudos adicionais, sugerem uma maior tendência da forma *molestus* para explorar habitats intradomiciliares/antropogénicos quando comparada com a forma *pipiens*. Em ambas as formas, mais de 90% das refeições sanguíneas foram realizadas em aves.

Foi ainda efectuada a primeira análise genómica focada na divergência entre os genomas das formas *molestus* e *pipiens*. Esta análise indicou uma baixa divergência entre os dois genomas (1,4%–3,1%), o que é consistente com um processo de especiação simpátrica com fluxo génico.

Finalmente, foram realizadas análises genéticas em amostras de *Cx. pipiens* s.s. colhidas na Grécia durante um surto de Febre do Nilo Ocidental, em 2010. Populações simpátricas de *molestus* e *pipiens* com introgressão assimétrica foram identificadas na região onde o surto ocorreu, enquanto uma população homogénea de *molestus* foi encontrada numa região sem transmissão do vírus.

Estes resultados evidenciam a importância da caracterização da variação genética e das relações evolutivas entre os membros do complexo *Cx. pipiens* para entender o seu potencial como vectores de doenças. Também abrem novas perspectivas para a investigação da ecologia e evolução deste complexo de espécies com importância médica.

CODICES, Vera Alexandra da Rosa (2012) Infecção por *Cryptosporidium parvum*: resposta imunitária e tecnológica de anticorpos monoclonais para o diagnóstico, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Cryptosporidium parvum é um protozoário intracelular, de distribuição ubiqüitária, que causa enterite em humanos e animais. A diarreia é autolimitada em indivíduos imunocompetentes, podendo ser fatal em imunocomprometidos. Actualmente não existem terapêuticas específicas ou preventivas disponíveis, e o elevado custo dos actuais métodos de diagnóstico, sustentam a importância do desenvolvimento de novas abordagens.

Vários estudos salientam a importância das células T CD4+ na resposta imunitária à infecção por *C. parvum*; outros direccionam a sua atenção para as células reguladoras (Treg); e outros tentam esclarecer qual o papel das citocinas específicas produzidas pelas células Th1 e Th2, na regulação da resposta imune, acompanhada pela produção de imunoglobulinas particulares. Na área do diagnóstico, vários e diferentes métodos têm sido utilizados, variando entre a rapidez de execução, especificidade e custo. Várias questões colocam-se, relacionadas com as características das células envolvidas na resposta à infecção e com a especificidade/sensibilidade de cada técnica.

Com o objectivo de estudar a resposta imunitária de longo-termo à infecção por *C. parvum*, no modelo animal imunocompetente, murganhos Balb/c foram inoculados por via oral com oocistos de *C. parvum*, e efectivadas colheitas e análise de amostras fecais, intestino, sangue e baço, segundo um protocolo previamente definido. A caracterização das populações celulares do sangue e baço foi feita por citometria de fluxo e a identificação e quantificação de imunoglobulinas e citocinas no soro, por tecnologia xMAP® Luminex. A análise por citometria de fluxo não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os murganhos infectados e os controlos, tendo sido apenas observado um aumento do número de neutrófilos e eosinófilos circulantes, e a sua posterior diminuição, no primeiro grupo de murganhos. Associada à elevada variabilidade observada após a reinfecção, tais variações são sugeridas como sendo o perfil exibido por estas populações de células no contexto de infecção por *C. parvum* no organismo imunocompetente, particularmente os eosinófilos, que apresentam um comportamento idêntico em infecção por outros parasitas. O aumento da secreção de TNF- α e IFN- γ (citocinas Th1) nos murganhos infectados, comparativamente com os grupos controlo, para além da secreção de citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10, após a reinfecção, sugere um balanço entre as respostas Th1, para controlar o crescimento do parasita, e Th2, para limitar a patologia.

A IgG1 foi o isotipo predominante ao longo de toda a infecção e reinfecção, tendo-se observado um pico de IgG2a após a reinfecção, seguido de diminuição. Esta variação poderá estar relacionada com a função da IgG1 e da

IgG2a, ao nível da opsonização e neutralização dos agentes patogénicos, respectivamente.

A obtenção de hibridomas secretores de anticorpos específicos para antígenos de *C. parvum*, por fusão celular, permitiu obter anticorpos e testar a sua aplicação à detecção de oocistos de *C. parvum*, em amostras fecais humanas e de animais (bovinos).

Em resumo, os resultados obtidos permitem sugerir o perfil de imunoglobulinas e citocinas envolvido na resposta à infecção por *C. parvum* no modelo roedor imunocompetente, assim como desenvolver um futuro “kit” para detecção de *C. parvum* em amostras biológicas, por técnicas de imunofluorescência.

FERREIRA, Pedro Manuel Machado Carlos (2012) *Lymnaea truncatula* em Portugal contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade Parasitologia. IHMT. Lisboa..

Resumo: *Lymnaea truncatula* é um gastrópode de água doce com importância em medicina por ser hospedeiro intermediário do tremátode parasita *Fasciola hepatica*. É o único hospedeiro intermediário desta espécie encontrado até agora em Portugal.

A fasciolose é responsável por perdas de produtividade em gado. Nos humanos, é uma parasitose emergente com relevo em saúde pública em várias regiões do globo.

Portugal é o segundo país europeu com maior prevalência.

L. truncatula é de difícil controlo por ser anfíbia e ter boa capacidade de sobrevivência e adaptação.

A eficácia dos programas de controlo e monitorização depende da correcta identificação das espécies de hospedeiros intermediários, dado que nem todas as espécies apresentam a mesma sensibilidade à infecção por *F. hepatica*. A morfologia da concha e a anatomia dos órgãos são insuficientes na identificação das espécies, sendo necessário usar técnicas de biologia molecular.

Os objectivos deste estudo foram: estudar a distribuição, a variação da densidade populacional ao longo do ano, a diversidade genética, os habitats e a influência de parâmetros físicos, químicos e biológicos, na densidade populacional de *L. truncatula* em cinco distritos portugueses (Coimbra, Évora, Leiria, Lisboa e Funchal).

Realizaram-se inquéritos malacológicos bimestrais durante 2 anos, entre Janeiro de 2006 e Dezembro de 2007 em Portugal continental e dois (Julho e Novembro de 2009) na ilha da Madeira. No continente, encontrou-se *L. truncatula* em: ribeiros temporários, com pouca vegetação, substrato de argila e matéria em decomposição e com água límpida, incolor e inodora, e com concentração de cálcio e de sulfatos até 50 mg/l e 267mg/l, respectivamente. A presença de outras espécies de moluscos, como *Planorbarius metidjensis*, *Lymnaea peregra* e da subclasse Prosobronchiata, assim como concentrações elevadas de nitratos, estão associados a uma menor densidade populacional.

Na ilha da Madeira, os habitats foram predominantemente: escorrimentos de encosta, permanentes, com fraca exposição solar, pouca vegetação, substrato de rocha, argila e matéria em decomposição e com água límpida, incolor e

inodora, acima dos 14,4°C. A densidade populacional diminui com o aumento dos valores de nitratos e aumenta com a concentração de cálcio na água.

As fezes de animais presentes junto às colecções de água não apresentaram ovos de *F. hepatica*. Foi encontrado um exemplar de *F. hepatica* no fígado de um gamo da Tapada Nacional de Mafra (distrito de Lisboa). Estudou-se a diversidade genética de *L. truncatula* através de RAPD-PCR e sequenciação do gene ribossomal 18S e da região ITS-2 (este também por PCR-RFLP).

Identificou-se pela primeira vez em Portugal continental e na ilha da Madeira uma espécie, geneticamente diferente mas morfologicamente muito semelhante a *L. truncatula* – *Lymnaea schirazensis*. Na ilha da Madeira, foi detectado um haplotipo distinto do presente no continente. O marcador de RAPD - OPA2 e PCR-RFLP com *Hpa*II, são bons marcadores para distinção entre *L. truncatula* e *L. schirazensis*.

Adicionalmente, detectou-se pela primeira vez na ilha da Madeira *L. (Pseudosuccinea) columella*, conhecido hospedeiro intermediário de *F. hepatica*.

Este estudo permitiu melhorar o conhecimento sobre hospedeiros intermediários de *F. hepatica* em Portugal, o que poderá melhorar o controlo e monitorização da fasciolose.

LAIRES, Raquel de Sá da Silva (2012) Trypanosoma brucei brucei peptidase inhibitors Immunolocalization, secretion and potential use as targets for therapy, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Celular e Molecular. IHMT. Lisboa.

Resumo: As peptidases encontram-se envolvidas em diversas funções biológicas possuindo um papel importante na patogenicidade de várias infecções parasitárias. Em mamíferos, a actividade peptídica é controlada por inibidores endógenos, como as cistatinas e as serpinas. Os genes que codificam para inibidores homólogos às cistatinas e serpinas de mamíferos, encontram-se ausentes do genoma de tripanossomatídeos. A ecotina é uma proteína de *Escherichia coli*, capaz de inibir uma grande variedade de peptidases serínicas da família S1A, tais como a tripsina. Existem duas proteínas do tipo da ecotina em *T. brucei*, ISP1 e ISP2. A ausência de peptidases sensíveis à acção dos ISPs no genoma de *Trypanosoma brucei*, sugere que estes tenham como alvo as peptidases serínicas do hospedeiro. Linhas celulares de *T. brucei* deficientes em ISP1 ($\Delta isp1$), ISP2 ($\Delta isp2$) e em ambos os ISPs ($\Delta isp1/2$) foram produzidas com sucesso e a ausência dos inibidores comprovada com o uso de anticorpos monoclonais específicos contra o ISP1 e o ISP2, que reconhecem a proteína alvo em extractos de proteína total de parasitas selvagens mas não em extractos de parasitas mutantes. O efeito da ausência dos ISPs nas células foi avaliado *in vitro* e *in vivo*, verificando-se que a deleção individual de cada ISP não produz qualquer efeito nos parasitas que revelam um crescimento normal em cultura e padrões de infectividade em murganhos idênticos aos de parasitas selvagens. Em contraste, os parasitas $\Delta isp1/2$, embora possuam um crescimento normal *in vitro* com ausência de alterações morfológicas grosseiras, são caracterizados por um alteração na mobilidade e pela acumulação de micro-vesículas na região da bolsa flagelar, consistente com um defeito no processo de

endocitose/exocitose. Adicionalmente, por imunofluorescência foi possível localizar os ISPs no citoplasma e na perto da bolsa flagelar. Em conjunto, estes dados sugerem uma função intracelular, independente da actividade inibitória dos ISPs e provavelmente associada ao flagelo ou à bolsa flagelar. O papel biológico dos ISPs na interação parasita-hospedeiro foi também avaliada através da infecção de murganhos com os parasitas $\Delta isp1/2$. A monitorização da infecção demonstrou que a deleção de ambos os inibidores resulta em sobrevivência prolongada dos murganhos com cargas parasitárias reduzidas, sugerindo que os ISPs possuem um papel importante na sobrevivência do parasita. Em contraste com os resultados obtidos em *Leishmania* que atribuem diferentes funções a ISP1 e ISP2, este estudo sugere que existe uma redundância funcional dos mesmos em *T. brucei*, sendo necessária a presença de ambos para que o parasita estabeleça eficientemente a infecção no hospedeiro mamífero. Foram também realizados estudos de imuno-protecção em murganhos de modo a determinar o potencial dos ISPs como alvos terapêuticos. A imunização com ISP recombinante e o tratamento com anticorpos específicos contra ISP1 e ISP2 não produzem qualquer efeito protector ou neutralizante da infecção de murganhos, sugerindo que estes inibidores não constituem bons candidatos para o desenvolvimento de uma vacina ou terapia baseada em anticorpos.

MONTEIRO, Maria Fernanda Afonso Dias (2012) Efeito dos factores do hospedeiro e parasitários na susceptibilidade à Malária e gravidade da Doença, Dissertação de Doutoramento no ramo de Medicina Tropical, especialidade em Patologia e Clínica das Doenças Tropicais. IHMT. Lisboa.

Resumo: A malária é considerada como a doença parasitária mais séria em humanos, infectando cerca de 5 a 10% da população mundial, estimando-se entre 300 a 600 milhões de casos e mais de dois milhões de mortes, anualmente. Apesar da severidade da doença, a compreensão da variabilidade da resposta do hospedeiro à infecção (traduzida desde a infecção silenciosa até formas crónicas da doença, passando por quadros clínicos potencialmente fatais), continua a ser um dos grandes desafios da investigação médica.

Vários factores genéticos parasitários ou do hospedeiro, estado imune e níveis de exposição, contribuem para esta variabilidade, mas a sua importância relativa para a carga total da doença tem sido pouco estudada. Entre outros, é possível salientar como fontes importantes de variabilidade na susceptibilidade à malária e gravidade da doença, factores intrínsecos ao hospedeiro tais como polimorfismos genéticos relacionados com as células sanguíneas e factores parasitários como a composição da(s) população(ões) parasitária(s) presentes na infecção.

Factores do hospedeiro humano relacionado com as células sanguíneas (drepanocitose e deficiência na glucose-6-fosfato desidrogenase - G6PD) têm sido tradicionalmente estudados e relacionados com a gravidade da malária causada por *Plasmodium falciparum*.

Relativamente às populações parasitárias, das cinco espécies que infectam humanos, *P. falciparum* continua a ser responsável pela malária grave, apesar de muito recentemente alguma gravidade ser atribuída a *Plasmodium vivax*.

Sabe-se que nas mesmas áreas outras espécies coexistem em muito maior prevalência, contrariando o que se pensava há algum tempo. Apesar de poucos estudos terem focado o tema das infecções mistas, existem alguns relatos de que eventuais interações entre as diferentes espécies presentes simultaneamente no mesmo hospedeiro podem afectar a susceptibilidade à doença.

Com o objectivo geral de avaliar o efeito e a contribuição destes factores na susceptibilidade e gravidade da malária, analisando e comparando três grupos (estudo de caso-controlo) doentes com malária grave (MG), doentes com malária não-complicada (Mnc) e indivíduos infectados assintomáticos (IA), realizámos em Angola de 2007 a 2010, um estudo em sete das 18 províncias com distintos níveis de endemicidade. Foram obtidas 1.416 amostras de sangue periférico de 1.198 indivíduos assintomáticos e 218 doentes. O DNA obtido a partir destes isolados foi utilizado para detecção da presença de variantes genéticas relacionados com os eritrócitos (drepanocitose – análise do gene *HBB*, deficiência G6PD – análise do gene *G6PD*, antigénio Duffy-análise do gene *DARC*) e identificação das espécies de *Plasmodium* presentes, através de nested-PCR mediante a amplificação dos genes que codificam a subunidade menor do RNA ribossomal. Os resultados demonstraram prevalências superiores às anteriormente descritas em relação às seguintes espécies parasitárias: *P. falciparum* 98,2% vs 92,0% e *Plasmodium malariae* 10,7% vs 1,0% e inferior em relação a *P. vivax* 2,5% vs 7,0%. Foi reconfirmada a presença de *Plasmodium ovale* (descrita anteriormente), mas não publicada em documentos oficiais e relatada pela primeira vez em Angola a presença de infecções mistas (duplas e triplas) (15,7%) e de infecção por *P. vivax* em indivíduos Duffy-negativos (dados publicados). Relativamente aos polimorfismos relacionados com os genes *HBB* e *G6PD* e provável associação com a protecção à malária, os nossos resultados confirmam a associação do traço falciforme (heterozigotia *HbS*), com a protecção à doença (OR = 0,30; IC 95% 0,18-0,49; $p < 0,001$). Contudo, não foi encontrada, quer nos indivíduos hemizigóticos, quer nos heterozigóticos para o alelo G6PD (A-) nenhuma evidência para a protecção a malária (MG e Mnc) (OR = 1,69; IC 95% 0,91-3,13; $p = 0,096$). Os resultados desta investigação requerem um estudo mais aprofundado, com uma dimensão amostral maior, necessário à confirmação da nossa observação.

BISCAIA, André Rosa (2011) Satisfação no trabalho dos médicos de família dos Centros de Saúde Portugueses, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa

Resumo:

Introdução

A satisfação no trabalho pode ser definida como a atitude do indivíduo em relação ao seu trabalho e às condições em que este é desempenhado. Numa visão integradora, a satisfação no trabalho surge como elemento moderador entre variáveis das organizações – motivação, desempenho, envolvimento no trabalho, compromisso organizacional, cidadania organizacional, equidade – e do universo pessoal do trabalhador – satisfação com a vida em geral, qualidade de vida, saúde mental, stresse percebido, doenças. Os resultados de toda esta conjugação de variáveis têm consequências a nível pessoal para o próprio

trabalhador, para a organização para a qual trabalha e para a comunidade servida por essa organização que, por sua vez, actuam nos factores sociais, organizacionais e individuais que influenciaram essas consequências. É, portanto, uma variável fundamental mas a que não tem sido dada a devida importância no sistema de saúde português e nos médicos de família em particular. Finalidade A finalidade deste trabalho foi desenvolver uma abordagem útil da satisfação no trabalho dos médicos de família a exercer nos centros de saúde portugueses. Para essa abordagem propõe-se um modelo salutogénico - aumentar a compreensão do que é a satisfação no trabalho; desenvolver a competência de cada trabalhador, de cada organização, do sistema de saúde e da sociedade na mobilização de recursos para fazer face ao que é essencial à satisfação no trabalho; e reforçar a atitude de que ter satisfação no trabalho é um desafio que merece o empenho de todos.

Objectivos, população e métodos O objectivo geral foi caracterizar e compreender a satisfação no trabalho (ST) dos médicos de família (MF) a exercer nos centros de saúde (CS) portugueses quanto ao seu significado, importância, processo e factores associados. Para alcançar este objectivo optou-se por proceder a quatro estudos integrados num processo global de investigação-acção. O primeiro dos estudos foi da área da investigação metodológica, com a criação do instrumento de medida a utilizar nos outros estudos - um questionário adequado para medir a satisfação no trabalho dos MF portugueses,. O segundo foi um estudo observacional, transversal e analítico (com uma componente ecológica) da satisfação no trabalho dos MF e das variáveis com que está associada numa amostra bi-etápica, primeiro aleatória dos CS e depois de todos os MF dos CS seleccionados, de uma região de saúde de Portugal em 2002 -2003. O terceiro foi um estudo observacional, transversal seriado e analítico da satisfação no trabalho de todos os MF em três momentos de um centro de saúde - 2000 a 2007 - e de uma Unidade de Saúde Familiar de 2007 a 2009 (este também foi um processo de investigação-acção participada). O quarto e último é um estudo qualitativo, multicêntrico, de análise da opinião dos MF, chefias intermédias e directores de centros de saúde de diferentes regiões do país sobre os factores associados à satisfação no trabalho, utilizando focus groups.

Resultados e discussão

O processo de investigação-acção proposto conseguiu produzir mudanças na prática e levar à teorização de modelos de abordagem da satisfação no trabalho, como o Pentágono da Qualidade, que foram considerados inovações e têm sido utilizados nas unidades estudadas e em outras.

O processo de investigação utilizou uma abordagem multi-canal recorrendo a métodos mistos que forneceu uma visão da complexidade da satisfação no trabalho de ângulos diferentes e complementares. Baseou-se, igualmente, num questionário adequado para os MF para medir a satisfação no trabalho, construído pelo autor para esta investigação.

A análise dos resultados foi efectuada recorrendo a análises bivariadas e modelos de regressão linear múltipla. A discussão dos resultados, um processo de investigação em si mesmo, baseou-se na cristalização do sentido dos mesmos e na sua apresentação e discussão em múltiplos contextos. As conclusões deste processo podem-se resumir nos seguintes pontos:

I - a satisfação no trabalho dos médicos de família é um conceito multidimensional e sensível a variáveis individuais e contextuais; II - o nível médio de satisfação no trabalho dos médicos de família a exercer nos centros de saúde é relativamente baixo mas varia de centro para centro, pesando mais no sentido da satisfação as dimensões intrínsecas e no da insatisfação as

dimensões extrínsecas; III - existe um conjunto de variáveis contextuais que estão associadas à satisfação no trabalho dos médicos de família que interessa conhecer, recolher e analisar de um modo sistemático; IV - a reforma dos cuidados de saúde primários 2005-... é considerada uma boa solução para muitos dos problemas que interferem com a satisfação no trabalho dos médicos de família; V - o sistema de saúde necessita de reforçar a orientação para os cuidados de saúde primários; VI - a satisfação no trabalho dos MF está associada ao seu desempenho; VII - a satisfação no trabalho dos MF está associada às suas cognições de saída da profissão, da carreira e do centro de saúde onde actualmente estão colocados; VIII - a satisfação no trabalho dos MF está associada à sua autopercepção do estado de saúde; IX- a satisfação no trabalho dos MF está associada às suas expectativas com a carreira profissional.

X - há uma recursividade entre satisfação no trabalho dos médicos de família / desempenho / contexto organizacional / satisfação do utente que é necessário compreender para se proporem e implementarem abordagens integradas.

A principal conclusão é que a satisfação no trabalho dos médicos de família é um desafio que importa abraçar. A importância surge de uma dupla constatação: a ST é relevante, actuando numa teia relacional que se estende das dimensões individuais às sistémicas, e é manejável. Esta tese identificou relações entre a ST e outras variáveis com potencial para afectar 4 das 6 dimensões da qualidade que se consideram na saúde: acesso, carácter apropriado dos cuidados, aceitabilidade dos cuidados e a eficiência. Por outro lado, a correlação da ST com a auto-percepção do estado de saúde dos MF é forte.

Como medidas mais relevantes a implementar, sugere-se: • a nível micro - uma abordagem integrada em todos os factores da ST mas mais forte no enriquecimento do trabalho e na diminuição da pressão no trabalho e a generalização do modelo da actual reforma dos cuidados de saúde primários; • a nível meso – instituir observatórios e planos de recursos humanos da saúde; requalificar as instalações dos centros de saúde; instituir programas de saúde ocupacional; • a nível macro – melhorar os sistemas de informação e reforçar a orientação do sistema de saúde para os cuidados de saúde primários.

CAMPOS, Paulo Adão de (2011)- Caracterização de factores de risco da malária placentária por *Plasmodium falciparum* em Luanda. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: A malária causada por *Plasmodium falciparum* é a maior causa de morbilidade e mortalidade materna e infantil na África subsahariana. O objectivo desta tese foi caracterizar factores do parasita e do hospedeiro que são determinantes para o desenvolvimento das manifestações patológicas da malária placentária em Luanda. Os objectivos específicos foram: 1. Determinar a prevalência da infecção por *P. falciparum* e caracterizar os factores de risco de malária em mulheres grávidas que recorrem à consulta pré-natal; 2. Determinar a prevalência da infecção placentária por *P. falciparum*. 3. Caracterizar os factores socioeconómicos e avaliar a eventual existência de associações com malária placentária, baixo peso à nascença, anemia,

prematuridade, risco acrescido de mortalidade para o recém-nascido, malária congénita e paridade. 4. Caracterizar genotipicamente os parasitas na placenta, sangue periférico da mãe e sangue do cordão.

Métodos: (I) De Abril a Setembro 2008, 679 mulheres grávidas que acorreram à consulta pré-natal foram envolvidas no estudo após consentimento informado. O perfil sócio-demográfico, história de malária e obstétrica foram investigados através de um questionário. O diagnóstico foi efectuado por microscopia óptica e as concentrações da hemoglobina foram determinadas pelo método do ácido hemático segundo Sahli *et al.*, (1984), usando hemoglobinómetro (HaemoCue, Switzerland) a todas as mulheres recrutadas. Foi analisada a associação entre a idade, paridade, tempo de gestação, residência, escolaridade, malária durante a gravidez, anemia e tratamento com a infecção por *P. falciparum*. (II) O estudo envolveu 866 mulheres grávidas, em trabalho de parto nas Maternidades Lucrecia Paím e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula, de Abril 2006 a Fevereiro 2008. As mulheres só participaram no estudo após consentimento informado. Foi efectuado um questionário a todas as parturientes. *P. falciparum* foi diagnosticado por PCR, em três compartimentos: sangue periférico da mãe, do cordão umbilical e da placenta. Foi analisada a associação entre a idade, paridade, tempo de gestação, residência, escolaridade e malária durante a gravidez com a infecção por *P. falciparum* nos três compartimentos. (III) As amostras de 143 grávidas positivas por PCR para *P. falciparum*, em pelo menos um dos compartimentos, foram genotipadas utilizando microssatélites.

Resultados: (I) Das 679 mulheres estudadas, a média de idade foi 25,7 anos. No momento do estudo 10,9% mulheres estavam infectadas com *P. falciparum* no sangue periférico. O valor médio de hemoglobina foi $11,1 \pm 0,07$ g/dL, encontrou-se uma associação significativa entre a história de malária na gravidez e a anemia com a infecção actual por *P. falciparum*. (II) A média de idade das mulheres estudadas foi 24,1 anos, sendo 39,6% primigestas e 60,4% multigestas. No momento da pesquisa estavam infectadas por *P. falciparum* 15,6% e 12% destas tinham parasitas detectados em todos os compartimentos, sendo 47% na placenta, 8% no sangue periférico e 6% no cordão umbilical. (III) Os nove *loci* estudados revelaram-se altamente polimórficos, o número médio de alelos variou de 9,2 no cordão umbilical, 11 no sangue periférico, a 14,2 na placenta. O número efectivo de alelos foi geralmente menor no sangue do cordão umbilical. O número efectivo de alelos foi menor do que o número de alelos, indicando que muitos alelos têm baixa frequência ou são raros. A multiplicidade de infecção foi ligeiramente superior na placenta.

Conclusões: (I) Os resultados sugerem que a história de malária anterior na gravidez é um factor de risco para uma infecção actual e que a anemia foi uma complicação importante associada à malária, mesmo em mulheres que receberam tratamento durante a gravidez com sulfadoxina-pirimetamina. (II) A prevalência da malária placentária é maior do que a do sangue periférico. A presença de parasitas no sangue do cordão sugere malária congénita. (III) A comparação da frequência alélica no cordão umbilical, placenta e sangue periférico indica que não existem diferenças entre as subpopulações.

CASACA, Ana Leonor Vidal Gomes (2011) Uma abordagem yeast two hybrid para o estudo da replicação e patogénese do vírus da hepatite delta, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Celular e Molecular. IHMT. Lisboa.

Resumo: O vírus da hepatite delta (HDV) é o agente etiológico de uma das formas mais graves de hepatite viral e é ainda endémico em diversas regiões do globo, nomeadamente em África, na Amazónia e no Extremo Oriente. O HDV co-infecta ou super-infecta hepatócitos infectados com o vírus da hepatite B (HBV) aumentando em cerca de 10 vezes o risco de cirrose e hepatite fulminante. A associação clínica entre os dois vírus deve-se ao facto do invólucro do HDV ser constituído pelos antigénios de superfície do HBV (HBsAgs) que são necessários para a propagação da infecção.

O genoma do HDV é constituído por uma molécula de RNA de cadeia simples, circular, com cerca de 1.7 Kb, que possui cerca de 70% de emparelhamento interno. Foi identificada uma única grelha de leitura aberta (ORF) no RNA viral que codifica para o antigénio delta (HDAg). A ocorrência de um mecanismo de *editing* do RNA, resulta na expressão de duas formas do HDAg, a pequena (S-HDAg) e a grande (L-HDAg).

Várias funções essenciais para a replicação do HDV têm sido atribuídas a ambas as formas do HDAg, sendo a S-HDAg essencial para a acumulação de RNA viral e a L-HDAg responsável pela interacção com os HBsAgs para formar partículas virais. No entanto, dada a simplicidade dos seus componentes, admite-se que a replicação viral depende das interacções estabelecidas entre os HDAgs e factores celulares do hospedeiro. Apesar do número considerável de factores celulares descritos como interactores dos HDAgs ou RNA virais, a importância de muitas destas interacções não foi elucidada e muitas etapas do ciclo de replicação do HDV permanecem pouco claras. Para além disso, dado o número limitado de factores do hospedeiro que estão envolvidos na sua replicação, é muito provável que um número elevado de interactores do HDV permaneça por identificar.

Este trabalho teve como objectivo a identificação de proteínas de fígado humano capazes de interagir com os HDAgs, utilizando o sistema *yeast Two-Hybrid* (YTH). Identificaram-se trinta proteínas com capacidade de interagir com a S-HDAg no sistema YTH, sendo que estas proteínas se encontram envolvidas em diferentes processos celulares. Com base nas características funcionais, foram seleccionadas três destas proteínas e as suas interacções com a S-HDAg foram investigadas com maior detalhe. As três proteínas seleccionadas foram a ribonucleoproteína nuclear heterogénea C (hnRNPC), a *embryonic lethal abnormal vision like 1* (ELAVL1/HuR) e a proteína 2 de ligação a EBNA1 (EBP2). As duas primeiras são proteínas de ligação a RNA, previamente descritas como envolvidas em processos de replicações de outros vírus com genoma RNA, enquanto a EBP2, é uma proteína de localização preferencialmente nucleolar, tal como por vezes acontece com os HDAgs.

As interacções foram analisadas recorrendo a vários ensaios bioquímicos. No caso da hnRNPC e da HuR, após validação no sistema YTH, a capacidade de interacção com a S-HDAg foi confirmada quer *in vitro* por *blot overlay* quer *in vivo* por co-immunoprecipitação em células de hepatoma humano. Nas mesmas células, observou-se uma co-localização considerável entre os HDAgs e os RNAs virais. Finalmente, de modo a investigar a contribuição das proteínas hnRNPC e HuR na replicação do HDV, procedeu-se ao silenciamento destas

proteínas pela utilização de *short hairpin* RNAs (shRNAs) específicos para os mRNAs correspondentes. Observou-se que o silenciamento de ambas as proteínas hnRNPc e HuR endógenas, individualmente resultou numa diminuição acentuada nos níveis de expressão dos HDAGs.

No que respeita à EBP2, a interacção com a S-HDAg foi confirmada em condições *in vitro* com recurso a ensaios de *blot overlay* e de cromatografia de afinidade. A análise por imunofluorescência indirecta e microscopia confocal revelou co-localização elevada entre os HDAGs e a EBP2, principalmente nos nucléolos de células de hepatoma humano.

Finalmente, foi ainda utilizado o sistema YTH para estudar os mecanismos de importação dos HDAGs. Assim, este sistema foi utilizado com o propósito de identificar proteínas celulares capazes de interagir com um domínio específico dos HDAGs, o sinal de localização nuclear (NLS). Na pesquisa YTH realizada obtiveram-se 161 clones positivos, sendo que um deles mostrou codificar para a carioferina $\alpha 4$ (KPNA4). A interacção da KPNA4 com a S-HDAg foi reproduzida em condições *in vitro* através de um ensaio de cromatografia de afinidade tendo sido utilizadas formas recombinantes das duas proteínas.

Este trabalho permitiu identificar várias proteínas celulares que interagem com a S-HDAg. Obtiveram-se evidências sugestivas de que algumas das proteínas identificadas podem desempenhar funções importantes no ciclo de replicação do HDV e que abrem novas perspectivas para o estudo do ciclo de replicação do vírus.

CONCEIÇÃO, Maria Cláudia Rodrigues da (2011) Hospitais de primeira referência: distrito de saúde e estratégia dos cuidados de saúde primários em Moçambique, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.

Resumo: Esta tese é sobre os hospitais de primeira referência sem os quais não é possível haver “Saúde para todos”.

A estratégia dos cuidados de saúde primários é conceptualizada em alguns princípios básicos que incluem cuidados para todos (valores de justiça social), sustentáveis, com participação comunitária (as pessoas não são somente receptores de cuidados mas actores no processo de promoção da sua saúde e da dos outros) e acção intersectorial para a saúde. Durante os anos 80 os centros de saúde emergiram como operacionalização da estratégia dos cuidados de saúde primários, mas foi-se tornando, também, evidente que necessitavam de apoio hospitalar. A evolução do pensamento sobre o papel dos centros de saúde e dos hospitais levou a retomar o conceito de distrito de saúde. O distrito de saúde é o nível administrativo mais periférico do Sistema Nacional de Saúde, com área geográfica e população bem definidas, com centros de saúde e um primeiro nível de referência (hospital distrital), com todos os recursos da comunidade e outros prestadores de cuidados de saúde e com uma direcção que coordena todas as actividades de promoção, prevenção, curativas e de reabilitação da saúde.

No contexto de um distrito sanitário, os hospitais de primeira referência deveriam assegurar os cuidados e apoio tecnológico que por alguma razão (técnica, económica, operacional) não devam ser descentralizadas para um nível inferior. A referenciação a estes hospitais deveria fazer-se para a

realização de exames auxiliares de diagnóstico, opinião de especialista, intervenção técnica ou hospitalização, entre outros.

Desde o fim da década de oitenta que não é fácil localizar evidência empírica sobre o que estão a fazer este tipo de hospitais e se alguma vez fizeram o que normativamente está designado como o que seria o seu papel e função.

Finalidade e objectivos

Esta tese tem como finalidade melhorar a compreensão do contributo dos hospitais de primeira referência para o desenvolvimento do sistema de saúde moçambicano e para a fundamentação da organização do sistema de saúde com base no distrito de saúde/sistema local de saúde.

A tese foi desenhada para atingir os seguintes objectivos: 1. Descrever empiricamente o perfil do hospital de primeira referência Moçambicano e sua evolução desde a independência; 2. Descrever empiricamente o perfil do distrito de saúde Moçambicano; 3. Descrever o papel e a função esperada do hospital de primeira referência na estratégia de saúde de Moçambique e sua evolução desde a independência; 4. Identificar a diferença entre a função planeada e a função observada nos hospitais em estudo, nomeadamente no que concerne ao seu papel no distrito de saúde moçambicano; 5. Caracterizar a evolução dos hospitais de primeira referência na África subsaariana.

Métodos

Para alcançar a finalidade e objectivo enunciados desenhou-se um estudo explicativo sequencial em que há quatro sub-estudos: • Hospitais de primeira referência na África subsaariana: revisão sistemática de literatura; • O hospital de primeira referência no sistema de saúde moçambicano: revisão de literatura; • Hospitais de primeira referência em Moçambique: estudo descritivo transversal; • A evolução dos hospitais de primeira referência em Moçambique desde a independência: entrevistas a políticos responsáveis.

Resultados

O distrito de saúde em Moçambique caracterizou-se, em 2001, por escassez de oferta de cuidados hospitalares, heterogeneidade de modelos organizacionais, de referenciação de doentes, de formas de organizar o financiamento, do quadro de recursos humanos e da distribuição de medicamentos.

Em 2001, os 31 hospitais de primeira referência (HPR), em Moçambique, serviam, 250.000 habitantes, tinham cerca de uma centena de camas, um médico, um técnico de cirurgia, bloco operatório, enfermarias de medicina, pediatria, cirurgia e obstetrícia/ginecologia, e escassa capacidade de realização de exames de imagem e de laboratório. Realizavam a sua missão num contexto de escassez de recursos. A comparação dos dados de Moçambique com os disponíveis a nível africano revela, para Moçambique, menos recursos e mais população sob responsabilidade. O papel e funções definidoras do HPR, no distrito de saúde em Moçambique são: i) a prestação de cuidados de saúde (Cirurgia de urgência; Valências de medicina, cirurgia, pediatria e obstetrícia-ginecologia; exames complementares de diagnóstico e serviços de apoio: exames de imagem, laboratório, transfusão de sangue; actividades preventivas, não sendo esta função consensual); ii) Supervisão; iii) Formação e iv) Referência.

Os HPR são o nível mais negligenciado dos cuidados de saúde em Moçambique. Apesar da contínua presença de objectivos de desenvolvimento dos HPR nos documentos de planeamento, os HPR, basicamente, reabilitados, são praticamente os mesmos desde a independência. Já em relação à sua actividade, ao número de profissionais e à sua qualificação (número de médicos e técnicos de cirurgia), parece ter havido uma evolução favorável.

Em termos internacionais, embora pareça haver concordância normativa em termos do que deve ser o hospital de distrito desde a década de 80, pouco se tem feito para monitorizar a implementação e desenvolvimento das suas funções.

Conclusões

Uma das formas das universidades contribuírem para as reformas é pela criação e organização de conhecimento. Este conhecimento é necessário a alguns níveis que a seguir se apresentam:

1. Conhecimento sobre financiamento, custos e despesas dos HPR e dos distritos de saúde. Para fazer convergir os mecanismos de financiamento com as reformas dos CSP, necessárias para reorientar os sistemas de saúde, para a “Saúde para todos”, é necessário ter conhecimento de como é feito actualmente o financiamento dos distritos (que critérios, que quantias, que processos, que dificuldades) e, dentro dos distritos, dos HPR.

2. Adequação dos meios técnicos aos problemas de saúde e resultados da intervenção dos HPR. É necessário conhecer e monitorizar os problemas de saúde dos distritos, os recursos disponíveis, os obstáculos ao acesso aos cuidados e ao cumprimento da missão dos HPR, documentando a efectividade da intervenção dos HPR.

3. Papel social e político do hospital. O HPR tem uma função técnica, mas há outros papéis que estão menos documentados como os papéis social, económico e político.

4. Arranjos organizacionais no distrito e complementaridade de funções.

Persiste a necessidade de melhor documentar papéis, funções, objectivos e procedimentos entre as diferentes unidades de saúde do distrito ao nível distrital. Talvez seja desejável ter soluções distritais de complementaridade entre unidades sanitárias diferentes, atendendo ao contexto, mas isso deve ser descrito e avaliado.

5. Processos políticos de implementação dos distritos de saúde / sistemas locais de saúde.

Há necessidade de identificar as dificuldades de implementação dos HPR e do distrito de saúde, de analisar e clarificar o conhecimento sobre posições e actuações dos diferentes actores e interesses.

Em Moçambique, todas as reformas necessárias a melhorar o acesso, nomeadamente a cuidados de saúde hospitalares, a um nível próximo das populações e para um conjunto de serviços essenciais, vão exigir aumento de investimentos externos, reorientações de investimentos internos e fortalecimento interno nas capacidades de coordenação, negociação e regulação do Ministério da Saúde Moçambicano.

FÉLIX, Rute Castelo (2011) The role of detoxification in the mosquito *Anopheles gambiae* response to *Plasmodium* infection, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade Parasitologia, IHMT, Lisboa.

Resumo: A malária, uma das doenças mais devastadoras que ocorrem em África é causada por um parasita do género *Plasmodium* e é transmitida aos humanos por mosquitos vectores do género *Anopheles* durante a refeição de sangue. Apesar da resposta do mosquito à infecção por *Plasmodium* ter vindo a ser intensamente estudada nos últimos anos, as interacções entre o mosquito

vector e o parasita são muito complexas e, estão longe de serem completamente compreendidas. Este estudo tem como objectivo principal contribuir para o conhecimento da resposta do mosquito à infecção por *Plasmodium*, focando-se no papel das enzimas de detoxificação. Para atingir este objectivo realizou-se uma análise transcriptómica com microarrays, com o intuito de identificar alterações de transcrição de enzimas de detoxificação no mosquito *Anopheles gambiae* em resposta à infecção por *Plasmodium*. Esta análise permitiu identificar alterações na expressão de 254 genes de detoxificação no estômago e corpo gordo de *A. Gambiae* durante a invasão do intestino médio pelos oocinetos e durante a libertação dos esporozoítos do oocisto. Os resultados mostraram que a invasão do intestino médio pelos oocinetos causou alterações num maior número de genes em ambos os tecidos estudados, sendo o intestino médio do mosquito o tecido mais afectado nas duas fases da infecção do parasita. De todos os genes de detoxificação com expressão alterada, as tubulinas e os citocromos P450 destacaram-se e foram escolhidos para continuar o estudo. As tubulinas foram seleccionadas porque estão associadas à invasão do epitélio do intestino médio e a sua função na resposta à invasão do *Plasmodium* ainda não está bem definida. Os citocromos P450 foram seleccionados porque já foram descritos como tendo a expressão alterada em resposta ao *Plasmodium* e a outras infecções. Para identificar e caracterizar o papel das tubulinas durante a infecção pelo parasita e a sua possível associação com os citocromos P450 foi utilizado o silenciamento génico por RNA de interferência e a injeção de inibidores químicos de tubulinas. O silenciamento e co-silenciamento das tubulinas causaram um aumento da taxa e intensidade da infecção. No entanto, apesar de o aumento ser consistente não foi significativo. Por outro lado, a injeção de paclitaxel, um inibidor de tubulinas, aumentou significativamente a taxa e intensidade da infecção, fortalecendo a hipótese do envolvimento das tubulinas na resposta à infecção por *Plasmodium*. Este trabalho também mostrou que o co-silenciamento da *tubulina A* e *tubulina B* e a injeção do inibidor de tubulinas colchicine causam alterações significativas na expressão da *CYP6Z2*, sendo este proposto como um possível elo de ligação entre as tubulinas e os citocromos P450. Finalmente, uma análise comparativa foi realizada para estudar as regiões promotoras dos citocromos P450: *CYP6M2* e o *CYP6Z1*. Este estudo obteve novos dados sobre compostos que activam estes citocromos e quais os possíveis factores de transcrição envolvidos. Dos diferentes estímulos utilizados, a exposição a insecticidas e a bactérias foram os que mais afectaram estes citocromos. O conjunto total das diferentes abordagens utilizadas neste trabalho contribuiu para aumentar o conhecimento do papel das enzimas de detoxificação durante a passagem do parasita da malária pelo mosquito vector.

FORTES, Filomeno Coelho (2011) Perfil epidemiológico das principais doenças parasitárias endémicas em Angola: malária tripanossomose humana africana oncocercose schistosomose urinária, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade Parasitologia, IHMT, Lisboa.

Resumo

Indicadores da OMS apontam as doenças parasitárias como importantes factores de impacto sócio-económico que influenciam o fraco desempenho dos países no alcance das metas do milénio. Metade da população mundial continua sob risco de contrair **Malária** e em 2008 ocorreram cerca de 243 milhões de casos e 863.000 óbitos. Em 1995 o Comité de peritos da OMS apontava para 60 milhões o número de pessoas em risco de contrair a **Tripanossomose Humana Africana (THA)**, estimando 300.000 novos casos por ano em África. Em 2006, os Ministros da Saúde Africanos declararam a **Oncocercose** como causa maior de pobreza, considerando que acima de 120 milhões de pessoas em 19 países enfrentavam este problema, 2ª principal causa de cegueira no mundo. A **Schistosomose urinária** segundo a OMS afecta pelo menos 200 milhões de pessoas com mais de 700 milhões em áreas endémicas.

Em Angola, o Governo preconiza o controlo das grandes endemias como uma das prioridades no período 2008-2012. A guerra civil que devastou o país até 2002, criou uma situação de pobreza grave (60%-MICS 2000), com disseminação das doenças parasitárias endémicas como a malária, tripanossomose, schistosomose e a oncocercose sem se conhecer exactamente qual a sua magnitude.

Este trabalho teve como objectivos a análise da situação destas doenças a nível internacional e nacional, e a identificação de pontos críticos para o seu controlo.

A metodologia baseou-se em pesquisa bibliográfica, estudos epidemiológicos comunitários, uso de técnicas sero-imunológicas, parasitológicas e pesquisa de base molecular.

Resultados: A malária apresenta-se como principal doença parasitária a nível mundial e em Angola onde se verificou uma taxa de infecção assintomática de 45% (técnica PCR), predomínio do *Plasmodium falciparum* (87%), 20% de prevalência em > 5 anos e 14% em grávidas. O complexo *Anopheles gambiae* e o *Anopheles funestus* são os principais vectores. Estudos “in vivo” e de “resistência molecular” às monoterapias da malária, suportaram a mudança para as combinações terapêuticas à base de artemisinina. Estudos de mutações nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* do *Plasmodium falciparum* para a sulfadoxina+pirimetamina, e “Knockdown Resistance-KDR” aos insecticidas, questionam a

viabilidade do uso destas ferramentas no futuro, respectivamente no tratamento intermitente e preventivo na grávida e na pulverização intra-domiciliar residual com piretreoides. Estudos inéditos realizados em Angola visando a utilização de anticorpos anti-saliva do mosquito *anopheles*, provaram a sua utilidade como marcadores imunológicos.

A Tripanossomose Humana Africana em Angola, transmitida pelo *Tripanossoma brucei gambiensi*, encontra-se distribuída em 7 províncias com tendência regressiva, passando de 517 para 181 os casos notificados em 2008 e 2009 respectivamente, havendo um foco de *T. b. rhodesiense* em uma província. Estima-se em 30% a população em risco, no entanto, continuam evidentes as questões relacionadas com a ecologia do vector, as dificuldades com o diagnóstico e a toxicidade do tratamento.

A Oncocercose, hiper-mesoendémica em 9 províncias, atinge uma população de 3.418.551 pessoas que carecem de um tratamento de massas. A inexistência de um macrofilaricida e as dificuldades com o diagnóstico representam os problemas maiores em relação a esta parasitose.

A schistosomose urinária apresenta-se como a mais esquecida das doenças negligenciadas com grande impacto a escala mundial, e em Angola é endémica em todo o território com uma prevalência de 28%. A desparasitação de massas com praziquantel continua a ser principal medida disponível.

Estes resultados confirmam a importância destas doenças no contexto epidemiológico mundial e em Angola, e ressaltam dificuldades importantes que carecem de mais investigação da comunidade internacional.

MARQUES, Cláudia Silva (2011) - Actividade funcional dos neutrófilos durante a infecção por leishmania infantum. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: A presente dissertação tinha como objectivo geral aprofundar o papel desempenhado pelos neutrófilos durante as fases iniciais na infecção por *L. infantum*, contribuindo para o esclarecimento dos mecanismos de activação da imunidade inata e adaptativa. O estudo foi programado de acordo com três objectivos específicos, cujo desenho experimental, resultados e respectivas discussões se encontram descritos nos capítulos 2, 3 e 4.

No capítulo 1 foi efectuada uma introdução teórica sobre a patogénese da leishmaniose visceral, revendo os trabalhos relacionados com a interacção parasita-hospedeiro e focando o papel dos PMN, durante a infecção com *Leishmania*.

No capítulo 2 foi avaliado o efeito do parasita nos mecanismos imunológicos de neutrófilos, através da análise da fagocitose, respiração oxidativa, apoptose, quimiotaxia, desgranulação e expressão de citocinas, quimiocinas e receptores *toll-like*. Por outro lado, foi também analisada a influência dos neutrófilos na viabilidade e no crescimento do parasita. Verificou-se que o parasita induz a

activação de algumas das vias da imunidade inata dos PMN, nomeadamente mecanismos oxidativos e não oxidativos como a produção de ião superóxido e a exocitose das enzimas proteolíticas, NE e CatG. Porém, os parasitas mais aptos parecem causar a inibição da migração dos PMN e de mecanismos que levam à activação de outras subpopulações celulares, incluindo a expressão de quimiocinas (MIP-1 α), citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) ou do receptor *toll-like* 2, comprometendo o vínculo natural entre a imunidade inata e a adaptativa.

No capítulo 3 foi dissecada a interacção M ϕ -PMN durante a infecção *in vitro* por *L. infantum*, através da análise da capacidade fagocitária, expressão de citocinas, quimiocinas e receptores *toll-like* em macrófagos, e produção de metabolitos do óxido nítrico. Verificou-se que *L. infantum* induz a activação da resposta imunológica através da via de estimulação do TLR-4 de M ϕ modulando a expressão de quimiocinas e citocinas pró (TNF- α e IL-6) e anti-inflamatórias (TGF- β), potenciada pela presença inicial de PMN. O parasita parece também bloquear a produção de NO, e na fase inicial da infecção e na presença de PMN este bloqueio, associado a níveis reduzidos da citocina pro-inflamatória IL-1 β e da quimiocina MCP-1, induz um fenótipo anti-inflamatório, possivelmente para evitar o excesso de resposta inflamatória que advém da colaboração entre PMN e M ϕ . Todavia, o decréscimo drástico do parasitismo macrofágico deverá estar relacionado com outros factores imunológicos que podem ser potenciados pela cooperação dos M ϕ com os PMN e/ou interacção prévia dos PMN com o parasita. No capítulo 4 foi avaliado *in vivo* o papel dos PMN durante o início da infecção experimental por *L. chagasi*, através da imunofenotipagem das populações leucocitárias recrutadas para o local da inoculação dos parasitas, da determinação da presença do parasita e da quantificação da expressão de citocinas em órgãos internos após depleção de PMN. Observou-se que a ausência de PMN, apesar de não influenciar as populações leucocitárias no local de infecção, parece retardar a remoção dos parasitas e afectar a possível migração de leucócitos parasitados para os órgãos internos, nomeadamente para os gânglios cervicais. No entanto, em qualquer das situações há disseminação dos parasitas para os gânglios. A depleção de PMN parece também influenciar o perfil de citocinas induzidas pelo parasita no início da infecção, conduzindo à expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL1- β , TNF- α , TGF- β e IL-17). A produção de granzima B juntamente com a inibição de IFN- γ numa fase posterior da infecção, é ainda um reflexo possível da ausência inicial de PMN.

Resumindo, na infecção por *L. infantum* os PMN, estão envolvidos no controlo inicial de uma parte dos parasitas, enquanto outros, provavelmente os mais virulentos, conseguem subsistir, reinfectar novas células e passar para as células hospedeiras definitivas, os M ϕ que são recrutados ao local de infecção através do estímulo provocado por quimiocinas. Os M ϕ , por sua vez, expressam o receptor de reconhecimento *toll-like* 4 e citocinas pró-inflamatórias associadas à inibição da expressão da IL-1 β . Numa fase posterior da infecção, a expressão de TLR-4 mantém-se mas a carga parasitária diminui drasticamente.

Independentemente da presença de PMN no local de infecção, os parasitas são disseminados para os órgãos linfóides, porém, os PMN influenciam a regulação da complexa sinalização de citocinas nestes órgãos.

Este trabalho evidencia o papel crucial dos PMN no desencadear da resposta imunológica na infecção por *L. infantum*, sendo a primeira barreira de controlo contra o parasita através da indução dos mecanismos de imunidade inata, recrutamento e estimulação de outras células, nomeadamente M ϕ e linfócitos.

MENDES, Marta Maria Lavouras (2011) Analysis of changes in the host cell proteome during hepatitis D virus infection, Dissertação de Doutorado no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Celular e Molecular. IHMT. 2011.

Hepatitis delta virus is a very simple virus with a 1.7 kb, circular, ssRNA genome which codes for only one protein – the delta antigen (HDAg/ Ag). Replication occurs in the nucleus of host cells by a rolling circle mechanism and using host RNA polymerase II giving rise to genomic and antigenomic RNA and a 5'-capped, polyadenylated RNA that acts as mRNA. During replication an editing mechanism occurs in the antigenomic RNA extending the reading frame and a second form of the delta antigen is produced. Despite its simplicity, little is known about which host factors and/or mechanism are involved in, or used by HDV during replication and pathogenesis, mainly due to the lack of an appropriate cell culture system to study it. In a previous work, two proteins, HSP105 and hnRNP H were found to be differentially expressed during HDV replication. In order to determine if and how these proteins may be involved in HDV replication, several assays were performed. Furthermore, using a new model for HDV replication based on a tetracycline inducible cell line, alterations in the proteome of those cells resultant from HDV replication were also determined. This model devises a tetracycline inducible cell line, 293- Ag, in which Ag expression is under the control of tetracycline and cells 293-HDV, in which 293- Ag cell line is transiently transfected with HDV RNAs allowing HDV replication. Using an MS-based quantitative proteomics approach consisting in 16O/18O enzymatic labeling together with systems biology, an attempt was made to clarify HDV replication and pathogenesis mechanisms by determining changes in the host cell proteome during hepatitis D infection.

Results showed that HSP105 and hnRNP H affect HDV replication. HSP105 knockdown induced a decrease in LHDAG expression levels and an increase of HDV mRNA levels. Furthermore, HSP105 was also shown to interact with both delta antigens. HSP105 seems to be involved in the ribonucleoprotein (RNP) transport or anchoring in the ER, or even in viral particle assembly. As for hnRNP H, a knockdown of the proteins led to an increase of HDV mRNA levels and a decrease in the expression of the delta antigens. It was also shown that hnRNP H binds to SHDAg. hnRNP H may be recruited by HDV in order to induce alternative splicing of pre-mRNAs that will originate key proteins essential to viral replication.

In order to determine alterations in the host cell proteome during HDV replication, five proteome comparisons, between controls and experiments, were performed. Approximately, 1000 proteins per experiment were identified and from those about 600 proteins were quantified. Finally, 88 proteins were found differentially expressed during HDV replication. From those, most proteins were found to be involved in protein metabolism and energy pathways. It was also possible, using GOTM and IPA, to perform a deeper analysis of the results, by determining interactions between differentially expressed proteins and determine which canonical pathways were most affected by HDV replication. Results showed that several metabolic pathways and key proteins were shown to be associated with HDV replication. Anaerobic glycolysis, HIF1 signaling and G2/M checkpoint regulation were three of the most affected

pathways being the last pathway a key pathway in HDV replication leading to uncontrolled cell division.

NOGUEIRA, Paulo Jorge (2011) Ondas de calor: modelos de medição previsão e monitorização dos impactos na saúde, Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.

Resumo: Introdução: A ocorrência de ondas de calor, que se verifica com alguma frequência em Portugal Continental, é reconhecida como um problema de saúde pública. É sabido que as ondas de calor têm um grande impacto em Portugal em termos de mortalidade, estando por esclarecer de forma conclusiva o que se passa em termos de morbilidade. Muitos estudos apontam as consequências das ondas de calor e um número razoável aponta medidas a tomar no caso de ocorrência de ondas de calor de forma a minorar os seus efeitos. No entanto, a quantidade de estudos que propõem metodologias concretas, como modelos de previsão e sistemas de vigilância validados para as ondas de calor, é escassa o que limita a definição de políticas e de estratégias de intervenção.

Objectivos: O presente trabalho destinou-se a: definir e construir modelos da relação entre a ocorrência de diferentes níveis de calor e o respectivo impacto em termos de mortalidade; propor e testar metodologias de medição do impacto de ondas de calor na mortalidade; estabelecer capacidade de previsão e de mensuração dos impactos, a procurar o estabelecimento e a definição de um esquema de vigilância nacional dos períodos de excesso de calor e de mecanismos de vigilância da mortalidade de forma a permitir desenvolver respostas adequadas ao desafio de saúde pública que é o fenómeno das ondas de calor.

Material e Métodos: Para este trabalho foram usados números diários observados de mortalidade e de condições climáticas. Os dados de mortalidade tiveram duas fontes: a base de dados de mortalidade do Instituto Nacional de Estatística (INE), e dados de registos de óbito feito pelas Conservatórias do Registo Civil (CRC) do Instituto dos Registos e Notariado (IRN), geridos pelo Instituto das Tecnologias de Informação na Justiça (ITIJ). Para o efeito, foram considerados dados de mortalidade diária por “todas as causas” desde 1981 até à actualidade. Os dados de condições ambientais foram disponibilizados pelo Instituto de Meteorologia, consistindo em dados de temperaturas, mínimas, máximas e médias diárias e, ainda, temperaturas tri-horárias, de 1981 até à actualidade.

Para alcançar os objectivos estabelecidos delineou-se um conjunto de seis estudos sequenciais:

1. Estudo da distribuição das temperaturas do ar do distrito de Lisboa e em Portugal Continental;
2. Construção de modelos de previsão de mortalidade para o Distrito de Lisboa com base nas temperaturas do ar;
3. Construção de modelos regionais de previsão da mortalidade associada ao calor;

4. Construção de um índice-ÍCARO nacional e definição de um sistema nacional de vigilância de ondas de calor;
5. Construção de um sistema de vigilância diária da mortalidade em Portugal; e,
6. Avaliação da vigilância nacional de ondas de calor.

No que respeita a métodos: procedeu-se ao estudo da distribuição das temperaturas ao longo do período de Maio a Setembro e no espaço geográfico de Portugal continental (estudo 1); definiram-se novas propostas para a medição do impacto das ondas de calor na mortalidade e na morbilidade (estudos 2, 3 e 6); elaboraram-se novos Modelos de Regressão Linear Múltipla, usando o pacote estatístico SPSS/PASW Statistics (versões 15 a 18) e a plataforma R (estudos 2 e 3); e implementaram-se Sistemas de Vigilância de Ondas de Calor (integrando os modelos de previsão regionais obtidos, definições e propriedades de índices definidos) (estudo 4) e de mortalidade a nível nacional (estudo 6); a avaliação do sistema de vigilância de ondas de calor nacional foi feita usando os dados de mortalidade de 2007 a 2009 (estudo 6), consistindo na análise detalhada dos períodos de calor identificados pelo sistema de vigilância de ondas de calor no Verão do ano de 2009, no cálculo dos respectivos excessos de mortalidade usando o sistema de vigilância diário da mortalidade portuguesa e na discussão das múltiplas estimativas de excesso de mortalidade obtidas.

Resultados:

Do trabalho desenvolvido os principais resultados foram a obtenção de modelos de previsão da mortalidade associada à ocorrência de calor para o distrito de Lisboa, por regiões (conjuntos de distritos) e para as respectivas populações mais idosas com boas características estatísticas – bons níveis de ajustamento aos dados subjacentes –, e boas qualidades de identificação de níveis moderados e muito elevados de mortalidade no conjunto de 23 anos (1981 a 2003, 8399 dias), donde se destacam elevados valores de especificidade; valores de sensibilidade que podem ser considerados óptimos; e valores muito elevados de probabilidade correcta de decisão, isto é, com probabilidade de afirmar correctamente que um dia é, ou não é, um dia com excesso de mortalidade, na ordem dos 99,5%.

Foram feitos contributos, muito específicos, para a modelação dos impactos das ondas de calor na mortalidade: a definição da variável *Sobrecarga Térmica Acumulada Generalizada* (STAG) com *limiar dinâmico de temperatura* resultou particularmente bem para a previsão da mortalidade associada ao calor na região de Lisboa, estabelecendo uma ponte entre uma hipótese de adaptação gradual das populações ao aumento progressivo das temperaturas ao longo do Verão e as referências na literatura que indicam maiores impactos de ondas de calor de acordo com a sua precocidade no Verão; o estabelecimento de modelos de previsão regionais trouxe também conhecimentos adicionais importantes como a definição clara de que o uso das temperaturas de todos os distritos da região é preferível a uma única temperatura de referência, que o uso de múltiplos limiares fixos de temperatura por região é uma solução exequível, que as variáveis sobrecarga térmica acumulada (generalizada e não generalizada) demonstram importância também ao nível regional; verificou-se ainda que a definição de modelos para a mortalidade do grupo etário dos 75 ou mais anos, não indicou diferenças substanciais para o racional obtido para a mortalidade total, observou-se que os modelos tenderam a ser um pouco mais explicativos, ligeiramente menos complexos, com eventuais necessidades de

diferentes limiares de temperatura, mas globalmente com a mesma capacidade de assinalar correctamente um dia de Verão como sendo ou não um dia de onda de calor.

Foi demonstrada a possibilidade de estabelecer um sistema de vigilância de ondas de calor de âmbito nacional, com base em modelos de previsão estabelecidos para quatro regiões (conjuntos de distritos contíguos) definidas com base nas proximidades estatísticas das temperaturas máximas e mínimas dos distritos e nos respectivos números de óbitos por “todas as causas”, e num único índice que sumariza os resultados dos diferentes modelos de previsão para as regiões.

Cada um dos estudos levado a cabo respondeu a um conjunto de objectivos específicos cujos resultados foram sumariamente os seguintes:

Estudo 1 - Estudo da distribuição das temperaturas do ar do distrito de Lisboa e em Portugal Continental

- Foram definidos limiares teóricos para as temperaturas do ar cuja média aritmética nas semanas de 18 a 40 do ano civil rondou os 31°C.
- As temperaturas de Verão têm um padrão bem definido ao longo das semanas. As temperaturas aumentam até por volta das semanas 30-32 e voltam a decrescer posteriormente ao longo do término do período de Verão.
- Com base na distribuição geográfica (por distritos) dos percentis de 97,5% das temperaturas por distrito verificou-se que no Verão (de Maio a Setembro) Portugal apresenta um gradiente Norte-Sul, com Sul a tender ser mais quente (com a zona costeira do Algarve a escapar a esta tendência), e um gradiente Litoral-Interior, onde o litoral tende a ser mais “fresco” que o Interior.
- As temperaturas de todos os distritos de Portugal Continental demonstraram ser matematicamente modeláveis da mesma forma.

Estudo 2 - Construção de modelos de previsão de mortalidade para o Distrito de Lisboa com base nas temperaturas do ar

- Foram apresentadas e discutidas quatro propostas de limiares, construídos com base nas temperaturas do ar de Lisboa, para o estabelecimento de níveis de risco de impacto do calor na mortalidade. Estas propostas introduziram o aspecto novo de considerar limiares dinâmicos (com variação ao longo de período de tempo entre Maio e Setembro).
- Foram estudadas as propriedades do modelo para relação calor-mortalidade previamente estabelecido em Portugal. A adaptação deste modelo para a metodologia adoptada nesta dissertação mostrou que o modelo já dispunha de boas propriedades estatísticas com um R²-ajustado de 50,8%, porém sem normalidade dos resíduos (diferença entre valores de mortalidade observada e prevista pelo modelo).
- Mostrou-se a diferença conceptual entre a nova variável STAG e a variável Sobrecarga Térmica Acumulada (STA) que já existia anteriormente.
- Foram estabelecidos, usando Regressão linear múltipla, quatro modelos que incluíram limiares de temperatura fixos (modelo I) e dinâmicos (modelos II a IV), incluíram as variáveis STA e STAG para a mortalidade “todas as causas” de toda a população (todas as idades).
- Foram estabelecidos, de igual modo, quatro modelos similares para a mortalidade “todas as causas” da população com 65 ou mais anos de idade

que mostraram ter as mesmas características e ligeiramente melhores valores de ajustamento aos dados.

□ Foram também investigados os mesmos modelos restringindo os dados aos meses de Maio e Setembro na procura de identificar pistas que indicassem o melhor limiar dinâmico. Verificou-se que mesmo na ausência dos meses com as grandes ondas de calor e os respectivos impactos na mortalidade as mesmas características emergiam nesta abordagem.

□ Verificou-se que os modelos apresentaram coeficientes de ajustamento entre 50% (limiar fixo) e 68,9% (limiares dinâmicos).

□ Os modelos com limiar dinâmico com crescimento gradual no princípio do Verão começando nos 29°C e aumentando semanalmente 1°C até atingir 35°C (modelo IV) mostraram ter o melhor ajustamento. Este facto é compatível com uma adaptação a curto-prazo dos indivíduos à evolução de aumento das temperaturas ao longo do Verão.

□ O modelo IV mostrou ter elevados valores de especificidade (acima de 99%), elevados valores preditivos negativos (acima de 99%) e elevada probabilidade correcta de indicação de excesso de mortalidade apenas com base nas temperaturas do ar (99,7%).

Estudo 3 - Construção de modelos regionais de previsão da mortalidade associada ao calor

□ Com base nas temperaturas máximas e mínimas do ar e da mortalidade “todas as causas” por distrito foram estabelecidas quatro regiões (conjuntos de distritos contíguos) homogéneas.

□ Foi definida uma temperatura de referência para cada região consistindo esta na temperatura do distrito que apresentava melhor correlação com as temperaturas de todos os restantes distritos do grupo.

□ Foram estudados seis modelos para cada região para a mortalidade “todas as causas” de todos os grupos etários. E, foram estudados os mesmos seis modelos para cada região para a mortalidade “todas as causas” de todos dos indivíduos com 75 ou mais anos de idade. Globalmente observou-se:

o Todos os modelos obtidos se constituíram válidos para a relação entre ocorrência de calor e a mortalidade;

o O modelo regional que ensaiava o uso da temperatura do ar de apenas um dos distritos (temperatura referência) – modelo R V - mostrou ser o menos adequado;

o Os melhores modelos regionais obtidos incluíram sempre as temperaturas da maioria ou de todos os distritos da respectiva região;

o Todos os modelos incluíram as variáveis STA e STAG do próprio dia e do dia anterior;

o Todos os modelos incluíram os limiares fixos de 32°C e 35°C;

o Todos os modelos apresentaram valores elevados de especificidade;

o Todos os modelos apresentaram óptimos valores de sensibilidade;

o Todos os modelos revelaram muito bons valores de decisão correcta (acima de 99%) com o modelo R I – modelo que incluiu informação das grandes ondas de calor de 1981, 1991 e 2003, dois limiares fixos de temperatura 32°C e 35°C, as temperaturas de todos os distritos e as variáveis STA, STAG e EXC

(excesso de temperatura do dia) – a deter maioritariamente os valores das estatísticas de avaliação dos modelos mais elevados.

Estudo 4 - Construção de um índice-ÍCARO nacional e definição de um sistema nacional de vigilância de ondas de calor

□ Foi formalmente definido o conceito de Índice-ÍCARO (definição que já existia e que relacionava mortalidade prevista com impacto de calor com mortalidade esperada sem impacto de calor) e obtidas formalmente, pela primeira vez, um conjunto das respectivas propriedades.

□ Definiu-se um sistema de vigilância de ondas de calor e discutiram-se os aspectos positivos e negativos de um sistema baseado apenas numa cidade (Lisboa) com base na experiência empírica de 1999 a 2003.

□ Para estabelecer um sistema de vigilância de períodos de calor verdadeiramente nacional fazendo uso dos modelos de previsão regionais obtidos procurou-se a definição de um Índice-ÍCARO nacional que sintetizasse o verdadeiro risco nacional de observar impacto na mortalidade devido à ocorrência de calor. Este índice-ÍCARO nacional foi estabelecido como a média ponderada dos quatro índices-ÍCARO regionais com as ponderações feitas usando a população residente de cada região.

□ Foi definido um enquadramento genérico de interpretação dos índices do tipo-ÍCARO de forma a permitir uma interpretação uniformizada do potencial de risco associado à ocorrência de calor, entre todos os actores envolvidos na vigilância de ondas de calor, a que se chamou Índice Alerta-ÍCARO. Também se fez uma sistematização formal das respectivas propriedades. Este novo enquadramento uniforme de interpretação dos índices-ÍCARO relativos ao risco de mortalidade associado à ocorrência de calor, revelou-se de grande utilidade, tendo sido adoptado no documento do Plano de Contingência de Ondas de Calor de 2010 na definição dos respectivos níveis de alerta num período de tempo de menos de um mês (entre a sua primeira apresentação em contexto do lançamento da componente técnica da vigilância das ondas de calor e publicação do documento por parte da Direcção Geral da Saúde).

Estudo 5 - Construção de um sistema de vigilância diária da mortalidade em Portugal

□ Foi descrito e apresentado o sistema de vigilância diária da mortalidade Portuguesa (VDM), e mostradas as respectivas potencialidades, em particular no que respeita à sua capacidade de detecção e confirmação de fenómenos com impacto na mortalidade diária e semanal, onde se incluem as ocorrências de calor elevado ou ondas de calor.

Estudo 6 - Avaliação da vigilância nacional de ondas de calor.

□ Foi feita a avaliação do teste dos modelos estabelecidos, levada a cabo de 2006 a 2009, através da vigilância das ondas de calor (sistema de vigilância ÍCARO), para tal contando com a informação do sistema de vigilância diária da mortalidade (VDM). A avaliação dos modelos e dos respectivos Índices-ÍCARO cingiu-se ao ano de 2009 por haver necessidade de dispor de dados de mortalidade de referência que também foram gerados pelo sistema VDM. Assim, verificou-se:

□ Os modelos e os respectivos índices identificam períodos de calor associados à existência de mortalidade para além da esperada;

□ O sistema de vigilância de períodos de calor com potenciais impactos na saúde humana, apoiado nos modelos desenvolvidos, permite identificar

impactos na mortalidade de todas as magnitudes (desde apenas de cerca de uma dezena de óbitos até às centenas ou milhares), com capacidade de revelar as heterogeneidades das ondas de calor ou das regiões onde elas ocorrem, e mostrou-se particularmente sensível a detectar situações limiares de ocorrência de calor, capacidade que não estava anteriormente demonstrada;

- A magnitude do excesso de mortalidade associada ao calor definida *a priori* pelos índices-ÍCARO mostrou-se associada à dos respectivos excessos definidos *a posteriori* por outras metodologias;
- Foram usados dois métodos para determinar excessos de mortalidade: um método de comparação directa da mortalidade de períodos homólogos e equivalentes, e outro usando regressão cíclica – verificando-se que o primeiro gerou sempre estimativas, e estas foram sempre consistentes, enquanto o método de regressão apresentou fragilidades quando o número médio de óbitos diários em análise foi baixo, mas resultados particularmente robustos quando apreciada a mortalidade total;
- Os resultados de excesso de mortalidade identificados no ano de 2009, ano cujo Verão foi percebido como moderado, mostraram-se relevantes do ponto de vista da saúde pública, o que aconselha que a tomada de medidas apropriadas para mitigação dos efeitos nefastos do calor não deve esperar por grandes períodos de calor.

Conclusões: Os modelos de previsão desenvolvidos e estudados nesta dissertação mostraram-se consistentes e evidenciaram capacidade de previsão, consubstanciada na identificação de pequenos impactos na mortalidade da população devidos à ocorrência de calor (capacidade não previamente identificada noutros trabalhos), permitindo estabelecer um sistema de vigilância de períodos de calor com potencial nefasto na saúde da população portuguesa de verdadeiro âmbito nacional, e havendo, em consequência, motivado e incentivado já a criação de um sistema de vigilância da mortalidade com grande potencial de observação atempada dos fenómenos que a afectam e o desenvolvimento inerente da sua investigação.

Assim, os resultados desta dissertação, que consistiram em modelos adequados de previsão, em índices que permitem melhor comunicação e percepção do risco, no estabelecimento amplo e global de vigilância de ondas de calor ao nível nacional e na existência complementar de um sistema rápido de vigilância da mortalidade constituem contributos importantes para o conhecimento dos impactos da ocorrência de calor na saúde humana que podem contribuir para a melhor definição das respectivas políticas de saúde.

AGOSTINHO, Maria Helena (2010) Opções de utilização sequencial de anti retrovíricos em doentes com falência terapêutica em Angola, Dissertação de Doutoramento no ramo de Medicina Tropical, especialidade de Patologia e Clínica das Doenças Tropicais. IHMT. Lisboa.

Resumo: A infecção pelo VIH/SIDA constitui um dos principais problemas de saúde no Mundo e em África. A África Sub-sahariana detém actualmente 67% das infecções a nível global.

Angola, localizada na sub-região central de África (OMS) tem uma prevalência actual média estimada em 2.4%, estando rodeada a Sul e Leste por países de prevalências mais elevadas. Em Angola, predomina o VIH-1. Os dados publicados sobre a epidemiologia molecular do VIH em Angola mostram uma grande diversidade de subtipos e formas recombinantes circulantes (CRF), recombinantes circulantes únicas (URF) e amostras não tipificadas.

A motivação para o estudo presente foi o conhecimento ainda limitado sobre a infeção por VIH em Angola, desde a epidemiologia molecular às características clínicas, imunológicas, virológicas, resposta à terapêutica anti-retrovírica combinada (TARVc) e perfil de resistência do VIH à TARVc.

Foi estudado um coorte de 300 doentes adultos, com infeção por VIH, de 15 de Junho de 2006 a 15 de Junho de 2010. Predomina o género feminino, 65% (194/300) e o grupo etário dos 25 aos 39 anos, 62% (186/300). A mediana de idades é 33 anos, residem em Luanda 98% (295/300), 94% são angolanos, sendo os estrangeiros de S. Tomé e RDC. A Classificação CDC de 1993 na linha de base mostrou um predomínio de doentes da categoria clínica C, 53% (160/300), com uma ou duas doenças definidoras; 34% (101/300) dos doentes eram da Categoria C3 do CDC e 49% (147/300) tinham linfócitos T CD4+ abaixo das 200 cel/μl. A doença definidora mais frequente foi a Tuberculose, em 39% dos doentes (117/300). A mediana de linfócitos T CD4+ na linha de base foi de 195 cel/μl [1-1076]. Apenas 12,2% dos doentes (37/302) tinha T CD4+ de base superior a 500 células/μl. Determinou-se a carga vírica na linha de base, em 213 dos doentes (71%), verificando-se que 46% destes doentes (97/213) tinham cargas víricas superiores a 100.000 cp/ml, 32% (69/213) entre 10001 e 100000, 21% (45/213) entre 400 e 10000, 0,9% (2/213) abaixo de 400 cp/ml.

Iniciaram terapêutica anti-retrovírica no período de estudo 206 doentes (69%) com esquemas terapêuticos baseados em NNRTI, sendo 131 (64%) medicados com a associação d4t+3TC+ NVP. Ao fim de 4 anos, em Junho de 2010, havia 126 doentes monitorizados com contagem de linfócitos T CD4+ e CV, estando 62% dos doentes com CV indetectável (79/126). Os doentes em falência virológica corresponderam a 16% (20/126), 9% (11/126) tinham resultados discordantes (boa resposta imunológica mas carga viral detectável) e 13% (16/126) foram inconclusivos. Foi mudada a terapêutica para esquema de 2ª linha em 5 doentes, 4 dos 5 doentes com critérios de falência virológica e 1 sem critérios de falência virológica, por toxicidade ao EFV.

Os doentes com critérios de falência imunológica ou virológica segundo a OMS e os doentes com dados inconclusivos foram seleccionados para testes genotípicos de resistência aos anti-retrovíricos (TR). Foram realizados TR e subtipagem em 37 doentes. Nos doentes que realizaram TR sob TARVc, as mutações de resistência mais frequentemente encontradas foram a M184V, em 16 doentes, a K103N em 12 doentes e a Y181C em 7 doentes. O subtipo C, foi o subtipo predominante em 30% (11/37) dos casos.

Para avaliar a adesão à TARVc, foram estudados 63 doentes, faltosos a consultas ou demonstrado sinais de falência clínica, imunológica ou virológica. O método realizado foi o auto-relato por entrevista. Verificou-se uma adesão à TARVc de 100% em 33% (21/63), adesão entre 100% e 90% em 7% (4/63), de 50 a 90% em 7% (4/63) e inferior a 50% em 54% (34/63). Como factores de não-adesão, predominavam a mobilidade no emprego e factores familiares e sociais, apontados como razão para a falta às consultas que davam acesso aos medicamentos ARV. Fazendo corresponder os resultados dos testes de resistência realizados à adesão de todos os doentes entrevistados, verifica-se que o grupo de 34 doentes com menos de 50% de adesão, 19 realizaram TR e

desses, 13 mostraram mutações de resistência, sendo 10 resistentes a 2 classes de ARV, NITR e NNITR, 2 a NNITR e 1 a NITR. Os restantes 6 doentes deste grupo eram aparentemente susceptíveis às 3 classes de ARV.

Actualmente, estão em seguimento 58% dos doentes (176/300), 26 % (77/300) perderam-se no seguimento e 16% (47/300) faleceram.

O estudo realizado salienta a fase tardia da chegada aos cuidados médicos; mostra a tuberculose como doença indicadora mais frequente e mostra que a maioria dos doentes foi medicada com D4T+3TC+NVP. Os critérios de sucesso terapêutico descem ao longo do estudo de 71% para 62%. Indica a necessidade de acções urgentes para acesso mais precoce aos cuidados de saúde e intervenção social para ultrapassar as limitações à adesão à TARVc e tornar esta mais eficaz. As opções de segunda linha já disponíveis são muito reduzidas (tenofovir, lopinavir potenciado com ritonavir e saquinavir), havendo necessidade de continuar estes estudos para uma avaliação mais profunda da eficácia destas terapêuticas.

AGUIAR, Pedro Vargues de (2010) Factores de prognóstico do resultado do tratamento de doentes com Síndrome de Dependência do Álcool: estudo de coorte prospectivo de 6 meses, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde e Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.

Resumo: Factores de prognóstico do resultado do tratamento de doentes com Síndrome de Dependência do Álcool: estudo coorte prospectivo de 6 meses

Introdução: Uma das questões fundamentais para as políticas de saúde relacionadas com o tratamento e reabilitação de doentes com dependência de álcool, é identificar factores de prognóstico num curto prazo de tratamento ambulatorio, de modo a se poderem otimizar as decisões de tratamento dos doentes. Assim, este estudo teve como objectivo identificar factores de prognóstico na admissão ao tratamento e factores de prognóstico durante o período de tratamento ambulatorio.

Materiais e métodos: Estudo observacional coorte de doentes com dependência de álcool observados num período de 6 meses de tratamento ambulatorio. O estudo consistiu numa amostra de 209 doentes incluídos no estudo de acordo com os critérios do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* versão IV, tendo sido recolhida no Centro de Alcoologia do Sul (n=194) e no Hospital Nossa Senhora do Rosário (n=15). 8 médicos psiquiatras destes dois centros de tratamento foram responsáveis pelo tratamento dos doentes. O doente ter um co-responsável que acompanhasse a sua reabilitação e fizesse a supervisão da medicação para controlo do consumo de álcool era condição absolutamente necessária para inclusão do doente no estudo. Como factores de prognóstico foram medidos na admissão ao tratamento factores sócio demográficos, a história de uso de outras substâncias e indicadores de gravidade associados à história de consumo excessivo de álcool. Durante os 6 meses de tratamento foram medidos factores de prognóstico que respeitam os fármacos para controlo do consumo incluindo Dissulfiram e Acamprosato, os factores associados aos aspectos não farmacológicos do tratamento incluindo o número de consultas, os factores associados às características do médico e finalmente os fármacos para

tratamento de depressão e ansiedade. As variáveis de resultado medidas no estudo envolveram o tempo até à primeira recaída pesada (variável de interesse primário para o estudo), a abstinência de consumo pesado, a abstinência de qualquer quantidade de álcool, o tempo cumulativo de abstinência acima da média dos doentes, o tempo máximo de recaída superior a 1 dia e o doente ter pelo menos um problema relacionado com o álcool aos 6 meses. Todas as variáveis resultado foram medidas através do calendário auto-reportado pelos doentes e seus co-responsáveis no que respeita os consumos diários *Timeline Followback*, à excepção da variável ter pelo menos 1 problema relacionado com o álcool aos 6 meses em que foi aplicado o instrumento *Alcohol Related Problems Questionnaire*. Foi estabelecido uma unidade padrão de consumo de álcool como uma garrafa de cerveja, um copo de vinho ou um cálice de bebida fortificada ou destilada que teriam aproximadamente 10 gramas de álcool, sendo considerado um consumo excessivo pesado de pelo menos 5 destas unidades padrão num dia típico de consumo, ou seja, pelo menos 50 gramas de álcool. Os dados recolhidos e validados foram analisados em *Statistical Package for Social Sciences*, tendo-se utilizado usuais métodos de estatística descritiva envolvendo tabulação de frequências e tabulação de medidas de tendência central e dispersão. Foram utilizados na análise bivariável entre os factores de prognóstico e as variáveis resultado o teste do Qui quadrado ou exacto de Fisher, o teste de Mann Whitney, o teste Kruskal Wallis, o coeficiente de correlação de Spearman e o coeficiente de concordância Kappa de Cohen. Foi ainda utilizado na análise bivariável a análise de sobrevivência de Kaplan Meier com teste log rank e a análise da área sob a curva ROC. Na análise multivariável foi utilizado a análise de regressão de Cox múltipla com razão de riscos medida pelo *Hazard Ratio* (HR) e a análise de regressão logística múltipla com razão de riscos medida pelo *odds ratio* (OR). O nível de significância foi estabelecido em 5%.

Resultados: Dos doentes admitidos a tratamento, 84% eram homens, a idade mediana era 41 anos, o consumo mediano de álcool era 192 gramas/dia e a duração mediana de consumo excessivo pesado era 13 anos. Os anos completos de escolaridade em tendência situaram-se abaixo do 9º ano de escolaridade com uma mediana de 6 anos. 61% dos doentes pertenciam a classes sociais média/baixa e baixa. A taxa de Kaplan Meier de recaída em consumo pesado foi de 23% sendo a taxa de recaída em qualquer quantidade de álcool de 54%. O tempo médio cumulativo de abstinência foi 131 dias. Relativamente aos factores de prognóstico que se revelaram estatisticamente significativos após análise de regressão múltipla foram; na admissão ao tratamento, o sexo feminino associado a pior prognóstico de tempo máximo de recaída superior a 1 dia (OR=4,55; $p<0,05$), o nível sócio económico de grau médio baixo e baixo associado a piores prognósticos relativamente à abstinência de consumo pesado (OR=0,32; $p<0,05$), abstinência de qualquer quantidade (OR=0,41; $p<0,05$) e tempo cumulativo de abstinência acima da média (OR=0,05; $p<0,01$), a situação profissional de emprego a tempo inteiro e vínculo associado a melhor prognóstico relativamente a menos problemas ligados ao álcool aos 6 meses (OR=0,37; $p<0,05$), a história de uso de cocaína associado a pior prognóstico relativamente à abstinência de consumo pesado (OR=0,11; $p<0,01$) e abstinência de qualquer quantidade (OR=0,05; $p<0,001$), ter mais de 20 anos de consumo excessivo pesado associado a pior prognóstico relativamente à abstinência de qualquer quantidade (OR=0,20; $p<0,05$), tempo cumulativo de abstinência acima da média (OR=0,05; $p<0,05$), tempo máximo de recaída superior a 1 dia (OR=8,36; $p<0,01$) e ter pelo menos 1 problema ligado ao álcool aos 6 meses (OR=7,32; $p<0,01$), entrar em

tratamento com menos tempo de abstinência, digamos até 7 dias sem beber, revelou-se associado a melhor prognóstico nomeadamente no tempo até à primeira recaída em consumo pesado (HR=0,32; $p<0,05$), mais gravidade da história de consumo indicada pelo doente consumir álcool de manhã e/ou antes do almoço revelou-se associado a melhor prognóstico, nomeadamente na abstinência de qualquer quantidade de álcool (OR=3,01; $p<0,05$), os doentes com valor de avaliação hepática GGT aumentada face ao limite normal revelaram pior prognóstico ao nível do tempo até à primeira recaída em consumo pesado (HR=2,48; $p<0,05$), os doentes com pelo menos 5 dos 11 problemas ligados ao álcool questionados no *Alcohol Related Problems Questionnaire* na admissão, revelaram pior prognóstico nomeadamente no tempo cumulativo de abstinência acima da média dos doentes (OR=0,04; $p<0,01$). Durante os 6 meses de tratamento, os factores de prognóstico que se revelaram estatisticamente significativos após análise de regressão múltipla foram; a toma de Dissulfiram por um período de pelo menos 120 dias, que se revelou associado a melhor prognóstico relativamente ao tempo cumulativo de abstinência acima da média dos doentes (OR=18,88; $p<0,01$) e o doente ter pelo menos 1 problema ligado ao álcool aos 6 meses (OR=0,16; $p<0,001$), o doente ter tomado Dissulfiram por um período inferior a 120 dias, que se revelou associado a pior prognóstico em todas as variáveis de resultado, ou sejam, o tempo até à primeira recaída em consumo pesado (HR=15,00; $p<0,001$), a abstinência de consumo pesado (OR=0,062; $p<0,001$), a abstinência de qualquer quantidade (OR=0,05; $p<0,001$), o tempo cumulativo de abstinência acima da média dos doentes (OR=0,08; $p<0,05$), o tempo máximo de recaída superior a 1 dia (OR=15,60; $p<0,01$) e ter pelo menos 1 problema ligado ao álcool aos 6 meses (OR=5,25; $p<0,05$), os doentes com indicação para Acamprosato tiveram pior prognóstico ao nível do tempo até à primeira recaída em consumo pesado (HR=2,60; $p<0,05$), os doentes que realizaram pelo menos 4 das 7 consultas previstas para os 6 meses tiveram melhor prognóstico relativamente à abstinência em consumo pesado (OR=9,10; $p<0,001$), abstinência de qualquer quantidade (OR=5,56; $p<0,001$), tempo cumulativo de abstinência acima da média (OR=177,50; $p<0,001$) e o doente ter pelo menos 1 problema ligado ao álcool aos 6 meses (OR=0,07; $p<0,001$), o doente ter pelo menos 2,5 de média nas fases da sua consulta (podendo variar as fases entre 1 e 4) têm melhor prognóstico ao nível do tempo até à primeira recaída em consumo pesado (HR=0,28; $p<0,01$), abstinência de consumo pesado (OR= 2,80; $p<0,05$), abstinência de qualquer quantidade (OR=3,24; $p<0,05$) e tempo máximo de recaída superior a 1 dia (OR=0,21; $p<0,01$), os doentes com indicação para ansiolíticos sejam eles Benzodiazepinas ou Buspirona tiveram pior prognóstico no tempo até à primeira recaída em consumo pesado (HR=2,12; $p<0,05$).

Conclusões: em termos de políticas de saúde, este estudo permite concluir que durante o tratamento ambulatorio devem ser valorizados o recurso farmacológico Dissulfiram com tempo de toma nunca inferior a 120 dias, a realização de um maior número de consultas previsto para o doente e a utilização de mais de duas fases nas consultas. Este estudo também revela que os prestadores de tratamento devem ter atenção aos doentes com indicação para a toma de ansiolíticos. Relativamente aos factores relevantes na admissão ao tratamento ambulatorio, este estudo permite-nos concluir que deve haver maior preocupação dos prestadores de tratamento relativamente às mulheres alcoólicas, aos doentes com nível socioeconómico mais baixo e doentes sem emprego a tempo inteiro nem vínculo, pois são factores que se revelaram associados a pior prognóstico. Também, os prestadores de

tratamento devem ter em especial atenção a história de consumo de outras substâncias, nomeadamente o consumo de cocaína, pois revelou-se associado a pior prognóstico. Em relação às variáveis da gravidade do consumo de álcool, os prestadores de tratamento devem tomar especial atenção que o prognóstico piora para os doentes que consomem álcool de modo excessivo pesado à mais de 20 anos, que tenham a avaliação laboratorial do GGT aumentada em relação ao normal e que revelem mais problemas ligados ao álcool no questionário *Alcohol Related Problems Questionnaire*. Este estudo também prova que se deve motivar o doente a iniciar o tratamento temporalmente o mais perto possível do início da abstinência. Mais concretamente, os doentes que iniciaram o tratamento até uma semana desde o início da abstinência tiveram melhor prognóstico. Curiosamente ainda uma informação útil para os prestadores de tratamento é que os doentes que consomem álcool pela manhã e/ou antes do almoço parecem estar mais motivados para recuperarem, tendo-se revelado um factor de bom prognóstico.

ALVES, Joana Baptista (2010) Epidemiologia da malária em Santiago Cabo Verde: factores genéticos humanos e estrutura populacional do mosquito vector, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: A malária, doença parasitária complexa que resulta da interacção entre parasita, hospedeiros humano e vector, constitui um dos principais problemas de saúde a nível mundial. À semelhança de outras doenças parasitárias e infecciosas a malária tem um papel importante na evolução, tendo já sido demonstrado o papel da variação genética humana na resistência à infecção.

Após quase meio século de controlo, a malária persiste na ilha de Santiago onde, apesar da baixa endemicidade, os indivíduos apresentam geralmente manifestações moderadas, são diagnosticadas infecções abaixo do nível detectável pela microscopia e o vector se encontra muito próximo da população supostamente susceptível, desconhecendo-se a frequência dos principais polimorfismos genéticos humanos mais relacionados com a doença e a estrutura populacional do mosquito vector.

Os objectivos gerais de trabalho desta tese assentam 1) no estudo dos dois clássicos factores genéticos do hospedeiro humano relacionados com a malária, nomeadamente os afectos à anemia das células falciformes, à deficiência em G6PD e a análise dum provável envolvimento da PK e 2) na análise genética das populações do mosquito vector, tentando contribuir para a compreensão da epidemiologia da doença na Ilha, e para a escolha de medidas de controlo apropriadas.

Os trabalhos incidiram na detecção do alelo responsável pela hemoglobina S, de polimorfismos no gene da G6PD e da PK em indivíduos não aparentados (Infectados e não Infectados) com análise da sua provável associação com a infecção e, ainda, na genotipagem de *loci* microssatélites de *Anopheles arabiensis* com recurso a técnicas baseadas na PCR.

Relativamente à anemia falciforme, a frequência dos portadores do traço (indivíduos *HbAS*) e do alelo *HbS* foi 6% e 5%, respectivamente, e para as variantes da G6PD, 0,8% para *G6PDA-* e 0,0% para a *G6PDMed*, não tendo

sido encontrado associação entre os genótipos desses dois factores e a presença de infecção. No que concerne ao gene *PKLR* não foi encontrada uma associação clara entre os polimorfismos analisados e o estado de infecção, mas foi detectado um acentuado desequilíbrio de *linkage* entre os *loci*, apenas nos Não Infectados, o que pode significar que essa região do gene, aparentemente conservada, tenha sido seleccionada por fornecer protecção contra a infecção e/ou doença.

A diversidade genética das populações de *A. arabiensis* em onze *loci* microsatélites foi moderada com valores médio de *He*, variando de 0,481 a 0,522 e a *Rs* de 4 a 5. O valor da diferenciação genética baseado em 7 *loci* polimórficos foi baixo ($F_{ST}=0,012$; $p<0,001$) mas significativo, variando entre 0,001 e 0,023 entre os pares de populações. Não foram detectados os alelos de resistência associados ao gene *Kdr*.

A baixa frequência dos alelos associados à G6PD (*A-* e *Med*) tem implicações importantes nas estratégias de controlo definidas pelo Programa Nacional de Luta contra o Paludismo (PNLP), uma vez que a primaquina pode continuar a ser administrada como complemento aos regimes terapêuticos, em caso de necessidade.

A população de *A. arabiensis* em Santiago revelou-se relativamente homogénea e com uma estrutura reduzida o que pode, por um lado, representar uma desvantagem por permitir uma provável dispersão dos genes de resistência. Por outro lado, essa relativa homogeneidade poderá representar uma vantagem para a introdução de um programa de controlo baseado na libertação de mosquitos transgénicos.

COSTA, Maria Ferreira da (2010) Epidemiologia e caracterização de espécies implicadas na microsporidiose humana em Portugal por análise parasitológica e molecular, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: Os agentes responsáveis pela microsporidiose e, designados, genericamente, por microsporidia são parasitas intracelulares obrigatórios, ubíquos na natureza. Os microsporidia inicialmente reconhecidos como agentes patogénicos de insectos e peixes, emergiram nas últimas décadas como um importante grupo de microrganismos responsáveis por infecção no Homem, associada à pandemia da sida. Encontram-se descritas na literatura mais de 1200 espécies de microsporidia, mas apenas um número reduzido é considerado infectante para o Homem. Entre os microsporídios mais prevalentes, responsáveis por infecção humana, encontram-se as espécies *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem* e *Encephalitozoon cuniculi*. Recentemente foi identificada em Portugal, uma nova espécie patogénica para o Homem - *Vittaforma-like*, em doentes seropositivos para VIH e em imunocompetentes.

No Homem, os microsporídios causam desde patologia gastrointestinal a infecções disseminadas variando os aspectos patogénicos da doença consoante a espécie envolvida assim como com a resposta imunitária do hospedeiro. Já foram descritos portadores assintomáticos de microsporídios, quer em imunodeficientes quer em imunocompetentes Actualmente, são ainda escassos os dados epidemiológicos sobre esta parasitose, e poucos os

estudos disponíveis sobre os animais identificados como potenciais hospedeiros dos parasitas infectantes para o Homem. Mais recentemente, o contacto com água infectada passou a ser considerado um factor de risco associado à microsporidiose humana.

A recente aplicação de técnicas moleculares ao diagnóstico e caracterização dos microsporidia, permitindo o reconhecimento de diferenças intraespecíficas, tem contribuído para uma melhor compreensão da epidemiologia destes parasitas.

O presente trabalho tem como objectivos: (i) determinar a frequência de infecção de microsporidia patogénicos para o Homem, numa população de seropositivos e seronegativos para VIH, em animais em estreito contacto com humanos e em água de abastecimento público, a fim de identificar, não só os parasitas infectantes para o Homem, como, também, os seus possíveis reservatórios zoonóticos e ambientais; (ii) caracterizar geneticamente as espécies e genótipos de microsporidia identificados na população humana, animal e em amostras de água de consumo público; (iii) avaliar a importância dos microsporidia na Saúde Pública Humana em Portugal.

No intuito de dar prossecução ao presente estudo, de modo a cumprir os objectivos propostos, foram adoptadas metodologias de diagnóstico e caracterização genética dos microsporidia, seleccionadas após extensa pesquisa bibliográfica. Todas as amostras foram analisadas simultaneamente pela técnica parasitológica de coloração Gram- Chromotrope e por PCR, com excepção das amostras fecais de animais silváticos de vida livre e da água de consumo público, que atendendo às reduzidas quantidades de amostra disponíveis, só foram estudadas pelas técnicas moleculares.

Para o presente trabalho foi efectuado um estudo retrospectivo e prospectivo, englobando 1989 amostras fecais de 856 doentes (adultos e crianças) seropositivos e seronegativos para VIH. A percentagem de doentes seropositivos para VIH estudados foi de 65,5% (561/856) e seronegativos para VIH foi de 34,5% (295/856). Do total de doentes (586 do sexo masculino e 270 do sexo feminino), 675 eram adultos e 181 crianças. Dos doentes analisados 57,6% apresentavam diarreia e 42,4% não apresentavam quadro diarreico. Nove (3,1%) dos 295 seronegativos para VIH apresentavam outras causas de imunossupressão. Uma frequência de infecção por microsporidia de 12,0% (103/856) foi observada nas fezes da população humana estudada, sendo que 13,9% e 8,5% das amostras fecais pertenciam a seropositivos e a seronegativos para VIH, respectivamente. A percentagem de crianças e adultos positivos para microsporidia foi de 18,8% e 10,2%, respectivamente. Os resultados obtidos permitiram determinar uma associação significativa entre a presença de infecção por microsporidia e os seropositivos para VIH, facto este que não constituiu um dado surpreendente em virtude do carácter oportunista largamente atribuído a esta doença, por outros autores. Foram identificados esporos de microsporídios nas fezes de doentes, que, embora sendo seronegativos para VIH, apresentam outro tipo de deficit imunológico. Através das técnicas de PCR, identificaram-se duas espécies de microsporídios nas amostras fecais dos doentes estudados no presente trabalho. *E. bienersi* foi detectada em 6,3% (54/856) e *Vittaforma*-like em 6,8% (58/856) dos doentes estudados. Na análise dos dados obtidos, não se verificou que a infecção por microsporidia, em geral, nem, especificamente, por nenhuma das duas espécies identificadas nas fezes estivesse, significativamente, associada a doentes com quadro diarreico. A caracterização genética da região ITS rRNA de 48 isolados de *E. bienersi* obtidos de humanos, de um total de 54

amplificados por PCR, permitiu identificar seis genótipos diferentes, Tipo IV (37,5%), Peru 6 (29,2%), D (12,5%), A (8,3%), C (6,3%) e PtEblI (6,3%). Até à data os genótipos A e C só foram identificados no Homem. Em contrapartida os genótipos Tipo IV, Peru 6 e genótipo D já foram descritos numa vasta gama de hospedeiros, incluído o Homem e outros animais (inclusive em cães, gatos e ruminantes em Portugal). A caracterização genética dos 58 isolados de *Vittaforma*-like revelou a presença de dois genótipos diferentes, previamente descritos em humanos: Isolado 5830 (39 amostras) e Isolado 5843 (19 amostras), com frequências de 67,2% e 32,8%, respectivamente.

Para o estudo de microsporidias em amostras de urina, foram recolhidos 69 amostras, retrospectivamente e durante o decurso do trabalho, pertencentes a 69 doentes (59 doentes seropositivos para VIH [85,5%] e 10 doentes seronegativos para VIH [14,5%] sendo 44 adultos (63,8%) e 25 crianças (36,2%). Do total de amostras de urina 48 (69,6%) eram de doentes do sexo masculino e 21 (30,4%) de doentes do sexo feminino. Foram identificados microsporídios em 1,5% (1/69) das amostras de urina, correspondente a um seropositivo para VIH (1,7%). A espécie identificada na urina foi *E. intestinalis* e a caracterização da sequência de um fragmento da região *SSU rRNA* revelou total homologia com diversas sequências previamente descritas em humanos e outros animais.

Para a identificação e caracterização de microsporídios em secreções pulmonares, foram analisadas 200 amostras, recolhidas retrospectivamente e durante o decorrer do estudo correspondentes a 124 expectorações induzidas (EI) e 76 lavados broncoalveolares (LBA). As amostras pertenciam a 150 doentes seropositivos para VIH (75%) e a 50 seronegativos para VIH (25%), sendo 129 (64,5%) do sexo masculino e 71 (35,5%) do sexo feminino. A percentagem de infecção por microsporidias foi de 1,0% (2/200) em secreções pulmonares da população estudada. Dois seropositivos (1,3%) apresentavam microsporídios, nomeadamente num LBA e numa EI. *E. cuniculi* e *Vittaforma*-like foram identificadas nos referidos espécimes. A caracterização da *SSU rRNA* para *E. cuniculi* revelou 99% de homologia genética nesta sequência com outras sequências previamente descritas em humanos para *E. cuniculi*, e para a espécie *Vittaforma*-like registou-se homologia genética com o Isolado 5830, previamente descrito em humanos em Portugal. Ambos os achados constituem os primeiros registos desta espécie em secreções pulmonares no Homem em Portugal.

A detecção e caracterização dos microsporidias em animais, incluiu estudos retrospectivos e prospectivos em amostras fecais de: 66 animais de companhia (oito cães e 58 gatos) e 50 cães errantes albergados em canis; 100 bovinos, provenientes de explorações leiteiras de várias regiões de Portugal; 103 animais cativos no Jardim Zoológico de Lisboa (75 espécies de mamíferos, 9 espécies de répteis e 9 espécies de aves); 134 pequenos mamíferos capturados nos concelhos de Moura e Aljustrel, Baixo Alentejo (52 insectívoros de espécie *Crociodura russula* e 80 roedores *Mus spretus* e dois *Apodemus sylvaticus*); 39 aves exóticas de gaiola de diversas espécies pertencentes às Ordens Psittaciformes e Passeriformes (31 de um criador de aves e oito de agregados familiares) e 52 pombos urbanos (Ordem Columbiformes), da região da grande Lisboa.

A maioria dos animais dos diversos grupos estudados não apresentava sintomatologia. Nos diversos grupos de animais estudados foram identificados microsporidias em amostras fecais de 8,6% de cães, 15,5% de gatos 40,7% de

aves de gaiola e pombos urbanos, 6,0% de bovinos e 1,9% de animais silváticos em cativeiro (Jardim Zoológico).

E. bieneusi foi identificada nas amostras fecais de cães e gatos analisados, cuja caracterização das sequências *ITS rRNA* dos 14 isolados de *E. bieneusi*, amplificados por PCR, veio revelar a presença de seis genótipos distintos: TipoIV, PtEbIV, Peru6, D, PtEbVIII e PtEbIX. Os genótipos PtEbIV, PtEbVIII e PtEbIX, foram descritos pela primeira vez no decurso deste estudo. Nos cães foram identificados os genótipos D (20%; 1/5), Peru6 (60,0%; 3/5) e PtEbIX (20%;1/5) e nos gatos os genótipos TipoIV (77,8%), PtEbIV (11,1%) e PtEbVIII (11,9%). Verificou-se associação com significância estatística da infecção pelo genótipo Tipo IV ao grupo dos gatos, relativamente aos cães estudados. Também nos bovinos, a espécie *E. bieneusi* foi identificada nas seis amostras positivas estudadas registando-se três genótipos diferentes (dois dos quais já previamente reportados): TipoIV (50%; 3/6), PtEbXI (33,3%; 2/6) e J (16,7%; 1/6) (AF135837). O genótipo PtEbXI foi caracterizado pela primeira vez no decurso deste estudo. A espécie *E. bieneusi* foi identificada nas amostras fecais de dois mamíferos do jardim Zoológico: o saguim de face branca (*Callithrix geoffroyi*) e o cavalo de Timor (*Tragelaphus strepsiceros*) e a genotipagem através da região *ITS rRNA* dos isolados de *E. bieneusi* permitiu caracterizar, pela primeira vez, durante o decurso deste trabalho, dois genótipos distintos: PtEbV (cavalo de Timor) e PtEbXII (saguim de face branca). A análise da diversidade genética da região *ITS rRNA* dos 10 genótipos diferentes de *E. bieneusi* identificados num total de 22 isolados de cães, gatos, bovinos e animais do Jardim Zoológico (um primata não humano e um bovídeo) estudados permitiu verificar a presença na maioria destes mamíferos (cães, gatos e bovídeos) de genótipos patogénicos para o Homem e de outros genótipos específicos de hospedeiro (cão, gato, bovinos e primata não humano), que, possivelmente, não terão impacte na saúde pública humana. Nos 134 pequenos mamíferos (*Crocidura russula*, *Mus spretus* e *Apodemus sylvaticus*) não foi observado nenhum animal com infecção por microsporidia. As espécies *E. bieneusi* e *E. hellem* foram identificadas, em 35,2% (32/91) e 13,2% (12/91), respectivamente, das aves de gaiola e pombos de parques públicos de Lisboa estudadas. Registou-se co-infecção por ambas as espécies. Ambos os microsporidia foram identificados nas três Ordens de aves: Psittaciformes (*E. bieneusi*- 12,5%; *E. hellem*- 12,5%); Passeriformes (*E. bieneusi*- 14,3%; *E. hellem*- 42,9%) e Columbiformes (*E. bieneusi*- 51,9%; *E. hellem*- 6,9%). Contudo, nos pombos (Columbiformes) registou-se uma elevada frequência de infecção por *E. bieneusi*, estatisticamente significativa, comparativamente à observada nas outras duas Ordens de aves. Para a espécie *E. hellem* a percentagem mais elevada de infecção nos Passeriformes (42,9%; 3/7), não apresentou significância estatística. A caracterização do locus *ITS rRNA*, dos 32 isolados, pertencentes à espécie *E. bieneusi*, revelou a presença do genótipo Peru6 descrito pela primeira vez em humanos, no Peru, e foi caracterizado pela primeira vez o genótipo PtEbII muito semelhante ao Peru6, com uma única alteração nucleotídica (G para A) junto da extremidade 3' do fragmento amplificado por PCR. Em pombos registou-se a presença simultânea dos dois genótipos. Nos 12 isolados de *E. hellem* identificados nas amostras fecais e/ou conteúdo intestinal e numa raspagem da traqueia da população de aves analisada, e caracterizados com recurso à sequenciação nucleotídica do fragmento do gene da *SSU rRNA*, verificou-se 99% a 100% de homologia genética das sequências obtidas com sequências do gene da *SSU rRNA*, previamente reportadas no homem e em aves (genótipos 1 e 2). No interior das regiões alvo, registaram-se três locais polimórficos, que permitem

agrupar em três tipos diferentes as 12 sequências dos isolados de *E. hellem* obtidos neste estudo: PtEhI (genótipo1, previamente descrito); PtEhII (99% homologia genética com genótipo 2) e PtEh III (99%de homologia genética com PtEhII).

No presente trabalho, também com o intuito de determinar a presença de esporos de microsporídios, foram analisadas 184 amostras de água, de locais de amostragem envolvidos no processo conducente ao abastecimento de água da cidade de Lisboa (175 amostras processadas de acordo com o método 1623 da USEPA e purificadas por separação imunomagnética [IMS] para os géneros *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* e nove sem IMS). Cento e seis eram amostras de água tratada (42 captações subterrâneas, 25 captações superficiais, 39 de água de abastecimento), provenientes de três Estações de Tratamento e reservatórios de água de abastecimento da cidade de Lisboa, e 69 eram amostras de águas não tratadas, obtidas em captações superficiais (30 amostras) e na captação subterrânea (30 amostras com IMS e nove sem IMS). As espécies *E. bienersi* e *Vittaforma*-like foram identificadas em água de abastecimento da cidade de Lisboa, tanto na água de origem superficial como subterrânea. A genotipagem de *Vittaformalike* revelou a presença de um genótipo Isolado 5830, descrito em humanos, em Portugal. Também o genótipo Tipo IV de *E. bienersi*, potencialmente infectante para o homem e outros animais, foi identificado em água tratada com origem subterrânea.

Em conclusão, o presente trabalho permitiu demonstrar a presença de espécies e/ou genótipos de microsporidia patogénicos para o Homem em seropositivos e seronegativos para VIH, em animais e em águas de consumo público, em Portugal.

Também na nossa população humana, tal como descrito na literatura, a infecção por estes parasitas, parece afectar os grupos mais susceptíveis, como os doentes com imunossupressão, crianças e idosos. Por outro lado, a identificação dos mesmos genótipos de microsporidia, com destaque para os genótipos de *E. bienersi*, em humanos e animais, sugere a ocorrência de transmissão zoonótica através de animais em estreito contacto com o Homem. Dos resultados obtidos verificou-se que, quer para os humanos, quer para os animais não foi observada associação directa entre a infecção por microsporidia e a presença de sintomatologia, nomeadamente de diarreia, sugerindo a existência, em ambos os grupos populacionais estudados, de portadores crónicos assintomáticos e salientando a sua importância no ciclo de transmissão destes parasitas.

Em suma a análise dos dados deste estudo sugere um papel relevante a nível da Saúde Pública, para os microsporidia circulantes, entre a população portuguesa, evidenciando a necessidade de implementar a pesquisa de microsporídios no diagnóstico de rotina, com recurso a métodos de referência bem definidos e adequados à sua utilização nos laboratórios de rotina. A metodológica adoptada neste estudo, nomeadamente as técnicas de PCR e sequenciação de DNA, traduziu-se numa abordagem eficaz para atingir os objectivos propostos.

Esperamos que os resultados obtidos neste estudo, contribuam para clarificar a epidemiologia da microsporidiose em Portugal, mais precisamente, os processos envolvidos na circulação e transmissão destes microrganismos oportunistas à população susceptível.

ESTEVEES, Francisco de Carvalho (2010) Identificação de múltiplos marcadores polimórficos em *Pneumocystis Jirovecii*: relação com a evolução clínica, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa

Resumo: *Pneumocystis jirovecii* é um importante agente infeccioso, causador de pneumonia (PPc) em doentes com infecção vírus da imunodeficiência humana/síndrome de imunodeficiência adquirida (VIH/sida), tendo sido, também, já descritos casos de infecção em imunocompetentes ou em doentes com graus moderados de imunodeficiência. Sequências polimórficas de ácido desoxirribonucleico (DNA) são detectadas frequentemente em isolados de *P. jirovecii*, sugerindo que a variação genética é comum neste microrganismo e que diversos subtipos genéticos podem existir. Permanecem por esclarecer as razões pelas quais os doentes sofrem de diferentes graus de severidade de PPc. Alguns estudos apontam para que determinados indicadores do prognóstico clínico possam estar relacionados com a apresentação e a evolução da infecção por *P. jirovecii*. Por outro lado, também é sugerido que polimorfismos específicos possam determinar características epidemiológicas do microrganismo, como a distribuição geográfica de determinados subtipos, os modos de transmissão, ou mesmo, fenómenos de resistência a fármacos, ou diferentes graus de virulência. Coloca-se a hipótese de que a virulência de um determinado subtipo de *P. jirovecii* possa estar dependente de múltiplos genes e, portanto, da associação de polimorfismos múltiplos que ocorrem em diversas regiões do genoma. Com o objectivo de identificar genes potencialmente associados com factores da infecção por *P. jirovecii* e com o propósito de desenvolver técnicas moleculares de alto rendimento, efectuou-se o estudo da variabilidade genética de isolados deste microrganismo, em Portugal. O trabalho envolveu a recolha de espécimes pulmonares de doentes infectados por *P. jirovecii* com diferentes características clínicas e integrou as metodologias de imunofluorescência indirecta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM), reacção de polimerização em cadeia (PCR), sequenciação directa, análise de fragmentos de restrição (RFLP), PCR *multiplex*, genotipagem por reacção de polimerização de base única (SBE), PCR em tempo real (RT-PCR) e DNA *pooling*.

Os genes candidatos considerados no presente estudo, foram seleccionados com base numa extensa pesquisa bibliográfica: o gene da subunidade grande do rRNA mitocondrial (*mtLSU rRNA*), o gene do citocromo *b* (*CYB*), o gene da superóxido dismutase (*SOD*), o gene da α -tubulina (α *TUB*), o gene da tiorredoxina reductase (*TRR1*), o gene da timidilato sintetase (*TS*), o gene da dihidrofolato reductase (*DHFR*), o gene da dihidropteroato sintetase (*DHPS*), a região conservada (*UCS*) dos genes da família das glicoproteínas major de superfície (*MSG*) e o gene da protease *kexin-like* (*KEX1*). Este procedimento inicial, permitiu avaliar o interesse relativo destes 10 *loci*, verificar a informação sobre as respectivas sequências, sua variabilidade, importância a nível metabólico e a potencialidade para estas regiões poderem estar relacionadas com características da infecção, como resistência a fármacos, ou factores de virulência.

A diversidade genética, as frequências de distribuição de genótipos e a relação entre os genótipos observados e diversos parâmetros da infecção, foram investigadas por PCR seguido de sequenciação directa, ou RFLP. A análise dos resultados permitiu confirmar o declínio das mutações associadas a fenómenos de resistência aos fármacos da família das sulfas, em Portugal,

provavelmente como consequência do decréscimo no uso de profilaxia anti-*P. jirovecii* com sulfas, após a introdução da terapêutica anti-retrovírica potente (HAART). Nos 10 *loci* de *P. jirovecii* analisados, foram identificados e caracterizados, um total de 23 polimorfismos, dos quais, quatro (*mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHFR312*) demonstraram estar relacionados com parâmetros clínicos da infecção, e, por isso, foram considerados como relevantes no seguimento da investigação. Verificou-se que um genótipo específico (*SOD110C/SOD215T*) demonstrou estar associado a casos de PPc com maior severidade, enquanto que outros dois genótipos (*mt85C/SOD215C* e *SOD110T/SOD215C*) foram associados a casos de PPc com menor severidade. A análise cruzada das sequências permitiu detectar correlações estatisticamente significativas entre diversos polimorfismos, sugerindo a existência de potenciais haplótipos. Observou-se um elevado grau de recombinação entre os genótipos multilocus (MLGs) de *P. jirovecii*, sendo que, um dos MLGs (MLG E) se encontrava sobre-representado na população, sugerindo uma estrutura epidémica, na qual o fenómeno de recombinação genética é frequente, mas onde ocasionalmente, um clone bem sucedido, tende, rapidamente, a aumentar a sua frequência originando um clone epidémico.

A técnica de PCR *multiplex*/SBE foi aplicada com sucesso na identificação de polimorfismos genéticos de *P. jirovecii* em *pools* de DNA, demonstrando que é possível uma análise num formato múltiplo, abrangendo um elevado número de amostras.

A metodologia proposta demonstrou ser uma ferramenta útil na caracterização do perfil genético de *P. jirovecii*, permitindo a amplificação e caracterização de diversos fragmentos, de uma forma rápida, implicando redução de custos e de tempo de operação, e possibilitando, a aplicação em larga escala. A associação das técnicas de PCR *multiplex*/SBE e de DNA *pooling* por RT-PCR permitiu determinar a distribuição das frequências relativas dos polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) *DHFR312*, *mt85*, *SOD215* e *SOD110* em subgrupos de doentes, com diferentes características clínicas. Esta abordagem, possibilitou a identificação de SNPs presentes nos diferentes subgrupos, permitindo a classificação de polimorfismos, aparentemente, não relevantes (ex. *DHFR312*), e, conseguindo seleccionar outros polimorfismos, potencialmente relacionados com diferentes parâmetros da infecção (ex. *mt85*, *SOD215* e *SOD110*). Assim, os SNPs seleccionados podem, de alguma forma, estar associados a haplótipos de *P. jirovecii* com características distintas, ou seja, potencialmente implicados em diferentes graus de severidade da doença.

Os resultados obtidos com o presente estudo, permitem colocar a hipótese de que haplótipos de *P. jirovecii* com características distintas podem existir, e que, regiões genéticas específicas podem funcionar como marcadores desses mesmos organismos. A aplicação das metodologias de alto rendimento, propostas nesta investigação, pode acelerar a identificação de polimorfismos de *P. jirovecii* relevantes a nível clínico, permitindo uma aproximação baseada em haplótipos para caracterização clínica deste microrganismo patogénico, auxiliando e adequando a escolha do tratamento mais indicado, possibilitando assim, um melhor controlo da doença. A robustez, sensibilidade e especificidade, demonstradas pelas técnicas de PCR *multiplex*/SBE e de DNA *pooling*, fazem com que sejam indicadas, não só para o estudo de *P. jirovecii*, mas também para o estudo de inúmeros microrganismos, em especial de microrganismos não cultiváveis, nos quais, a limitação da amostra, faz com que sejam requeridas técnicas de alta capacidade, para que seja possível a

caracterização de isolados, tal como ficou demonstrado, no presente estudo, para o caso de *P. jirovecii*.

FRONTEIRA, Inês (2010) Saúde dos enfermeiros: contributos para a sua compreensão, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade de Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa

Resumo: Os profissionais dos cuidados de saúde são essenciais ao desempenho de excelência dos sistemas de saúde pelo que devem ser capazes de funcionar em plenitude. A saúde é um activo para esse pleno funcionamento.

Os enfermeiros representam o grupo profissional mais numeroso dos profissionais dos cuidados de saúde. Como tal, têm um importante papel a desempenhar no sistema de saúde e na determinação da saúde da população. O desempenho dos enfermeiros, mas também as condições em que trabalham e o impacto destas na sua saúde, devem, assim, ser estudados.

Tem sido sugerido que os enfermeiros têm um perfil de saúde diferente do da restante população, com problemas de saúde específicos.

São vários os factores que influenciam a saúde: características e comportamentos dos indivíduos, ambiente económico e social e ambiente físico.

A saúde é entendida como um activo para a vida social e laboral plena e eficiente. Compreende-se que mais do que o somatório das diferentes dimensões, a saúde é a interacção e simbiose entre saúde física e mental, auto-percepção do estado de saúde e qualidade de vida e bem estar.

A saúde dos enfermeiros é determinada pelo sistema de saúde onde trabalham e, em última análise, pelos problemas e desafios que este enfrenta. O impacto destes desafios pode resultar no aumento do trabalho em tempo parcial, para além do tempo integral, do duplo emprego e insegurança laboral. Concomitantemente, os enfermeiros estão expostos a uma variedade de riscos ocupacionais que podem resultar numa série de problemas de saúde agudos e crónicos. Trabalhar em ambientes particularmente stressantes, em equipas com manifestas insuficiências, com pouco controlo e muita responsabilidade, muitas horas seguidas, com conflitos entre os diferentes papéis sociais, parece contribuir para o aumento da morbilidade dos enfermeiros. A relação com o outro, e o servir-se dessa relação para ajudar, coloca uma forte pressão emocional nos enfermeiros.

A presente investigação tem como objectivo contribuir para a compreensão do perfil de saúde dos enfermeiros e do papel que o trabalho de enfermagem, e no sector de saúde, têm no perfil de saúde.

A inteligibilidade desse contributo faz-se por analogia com os outros profissionais dos cuidados de saúde e com os outros profissionais e/ou população em geral.

Inclui uma revisão sistemática da literatura onde se revêem as evidências existentes sobre a saúde dos enfermeiros, o estudo dos Inquéritos Nacionais de Saúde de 1998/1999 e 2005/2006 e um estudo de mortalidade proporcional. Nestes dois últimos estudos faz-se a comparação entre enfermeiros, outros

profissionais dos cuidados de saúde e outros profissionais, utilizando a Classificação Nacional das Profissões na sua versão de 1994.

HIPÓTESES E OBJECTIVOS GERAIS

Foram enunciadas 7 hipóteses de estudo que versaram sobre o conhecimento científico sobre o perfil de saúde dos enfermeiros, o estudo do perfil de saúde (percepção do estado de saúde, morbidade, consumo de medicamentos, utilização dos serviços de saúde e despesas com a saúde e comportamentos ligados à saúde) e as causas de morte dos enfermeiros portugueses:

H1: As evidências científicas, baseadas em estudos experimentais e observacionais, demonstram que os enfermeiros possuem um perfil de saúde diferente do da restante população e dos restantes profissionais cuidados de saúde.

H2: Os enfermeiros, os outros profissionais dos cuidados de saúde e os outros profissionais percebem o seu estado de saúde de forma diferente;

H3: Os enfermeiros, os outros profissionais dos cuidados de saúde e os outros profissionais têm perfis de morbidade diferentes;

H4: Os enfermeiros, os outros profissionais dos cuidados de saúde e os outros profissionais utilizam os serviços de saúde de formas diferentes e têm diferentes despesas com a saúde;

H5: Os comportamentos relacionados com a saúde dos enfermeiros, outros profissionais dos cuidados de saúde e outros profissionais são diferentes.

H6: A exposição ao trabalho no sector da saúde causa determinadas doenças que levam a que, proporcionalmente, existam mais mortes por essas doenças nos outros PCS do que nos outros profissionais;

H7: A exposição ao trabalho de enfermagem causa determinadas doenças que levam a que, proporcionalmente, existam mais mortes por essas doenças nos enfermeiros do que nos outros PCS e do que nos outros profissionais.

Definiram-se os seguintes objectivos gerais:

1. Rever a evidência existente, publicada e não publicada, sobre a saúde dos enfermeiros (nas vertentes de saúde física, mental, auto-percepção do estado de saúde, estilos de vida e comportamentos ligados à saúde) e sua comparação com a dos outros profissionais dos cuidados de saúde e a da restante população.

2. Compreender se existem diferenças entre enfermeiros, outros profissionais dos cuidados de saúde e outros profissionais relativamente à auto-percepção do estado de saúde, morbidade, utilização dos serviços de saúde e despesas com a saúde e comportamentos relacionados com a saúde; 3. Compreender se existe excesso de mortes por causas específicas nos enfermeiros falecidos entre Junho e Setembro de 2003, em Portugal, quando comparados com os outros PCS e os outros profissionais.

MATERIAL, POPULAÇÃO E MÉTODOS

Revisão sistemática da literatura

Estudo observacional, retrospectivo e descritivo.

Identificaram-se as bases de dados a pesquisar tendo em conta o assunto em estudo, o tipo de documentos pretendidos e o intervalo de tempo da RSL. Convencionou-se que, em todas, deveria ser possível fazer a pesquisa *on-line*. Ao todo, foram pesquisadas 43 bases de dados, utilizando palavras chave em português e inglês (incluindo termos DeCS). A pesquisa limitou-se a documentos em inglês, francês, português, espanhol e italiano. Não foi estabelecido limite temporal e não foi feita pesquisa manual de bibliografia ou de referências.

Identificaram-se 2 692 documentos a cujos resumos se aplicaram três critérios de elegibilidade (teste de relevância).

Dos 2 692 documentos, 204 (7,6%) foram excluídos por não terem resumo e 1 428 (57,4%) por não cumprirem pelo menos um dos critérios de elegibilidade para esta fase.

Passaram à fase de avaliação do texto integral um total de 1 060 documentos. Destes 76 eram duplicados pelo que foram excluídos. A fiabilidade da aplicação do teste de relevância foi avaliada por um segundo revisor que aplicou os 3 critérios de elegibilidade a uma amostra aleatória simples dos documentos seleccionados a partir das bases de dados (coeficiente de Kappa=0,9; erro padrão=0,05; $p < 0,01$).

Aplicou-se um formulário de colheita de dados aos documentos seleccionados para avaliação do texto integral que continha uma série de critérios de elegibilidade baseados no STROBE e CONSORT *statement* e numa extensa revisão de literatura. Dos 984 documentos vários foram sendo excluídos por não se cumprirem critérios de elegibilidade do teste de relevância e metodológicos, acabando-se com 187 estudos sobre os quais foram colhidos dados sobre o local, contexto, participantes, resultados, intervenção, exposição, efeito e condição de interesse. Os estudos foram avaliados quanto à validade interna e externa.

Na análise dos dados utilizou-se a síntese narrativa. Não foi feita meta-análise dada a heterogeneidade encontrada. Como sistema de classificação das evidências utilizou-se o *Scottish Intercollegiate Guidelines Network*.

Estudo dos Inquéritos Nacionais de Saúde de 1998/1999 e 2005/2006: Auto-percepção do estado de saúde, morbidade, utilização dos serviços de saúde e despesas com a saúde e comportamentos relacionados com a saúde dos enfermeiros.

Estudo observacional, transversal e analítico.

Utilizaram-se como fontes de dados o 3º e o 4º Inquérito Nacional de Saúde. Definiram-se variáveis dependentes, independentes e de potencial confundimento.

Os dados do 4º INS foram analisados pelo Instituto Nacional de Estatística, após redacção das sintaxes pela autora. Neste caso realizou-se, apenas, análise estatística descritiva dado não ter sido possível aceder às variáveis de *clustering* e de estratificação. Recorreu-se às frequências relativas ponderadas (estimativas) para descrever as variáveis de escala nominal e ordinal e à média, mediana, amplitude do intervalo de variação e amplitude interquartilica para descrever as variáveis numéricas.

Os dados do 3º INS foram analisados tendo em conta o efeito de *clustering* e a estratificação, para controlar o efeito do desenho do estudo e para evitar erros tipo II, respectivamente. Utilizaram-se contagens não ponderadas, estimativas das proporções e médias populacionais. Apresentaram-se, conjuntamente, os intervalos de confiança a 95%. Na análise inferencial considerou-se o nível de significância a 95%. Consideraram-se, no processo de decisão estatística, os intervalos de confiança a 95% para a diferença entre as estimativas de cada uma das sub-amostras. O teste Qui-quadrado de Pearson com correcção de segunda ordem de Rao-Scott foi utilizado para testar diferenças entre variáveis de escala nominal ou ordinal em cada uma das sub-amostras. Utilizou-se o *odds ratio* e respectivo intervalo de confiança para a tomada de decisão sobre eventuais relações de dependência e para avaliar a força e direcção da associação. O teste F corrigido para o efeito do desenho pela estatística de Wald foi utilizado na análise da diferença da distribuição de uma variável de escala numérica e uma de escala nominal ou ordinal.

Utilizou-se a análise de regressão linear e logística binária, multinominal e ordinal para avaliar a existência de associação entre as variáveis dependentes

e independentes controlando para o efeito das variáveis de potencial confundimento.

Na análise, os dados com omissão foram considerados eventos aleatórios.

Mortalidade nos enfermeiros e outros PCS entre Junho e Setembro de 2003

Estudo observacional, transversal e analítico.

A população em estudo correspondeu à população residente em Portugal Continental e Ilhas dos Açores e da Madeira que faleceu entre 1 de Junho e 30 de Setembro de 2003 não tendo sido feita qualquer amostra.

Utilizou-se a base de dados dos certificados de óbitos ocorridos em território nacional entre 30 de Maio e 30 de Setembro de 2003, fornecida pela Direcção Geral da Saúde.

O estudo dos dados omissos revelou que estes eram eventos aleatórios pelo que era possível realizar a análise recorrendo a técnicas de dados completos.

Na análise das variáveis qualitativas nominais foram usadas frequências absolutas e relativas e moda. A variável quantitativa numérica idade foi analisada recorrendo à média e mediana, primeiro e terceiro quartil, amplitude interquartílica e total e desvio padrão, coeficiente de assimetria e curtose.

Realizou-se análise de correspondência múltipla de modo a definir perfis de mortalidade para os indivíduos falecidos no período em estudo que não tinham dados com omissão para a profissão.

Calcularam-se as proporções de mortalidade e a razão de mortalidade proporcional de modo a comparar as proporções de mortalidade observadas e esperadas por causa e grupo profissional.

RESULTADOS

Revisão sistemática da literatura

Existe **evidência de nível 2+** de que as enfermeiras

- estão em maior risco de desenvolver cancro da mama quando comparadas com outras profissionais dos cuidados de saúde;
- não têm maior risco de desenvolver doença de Hodgkin;
- não têm um excesso de risco de cancro (independentemente da localização), cancro do estômago, cólon, recto, pâncreas, ovário, rim, bexiga, cérebro, tiróide ou linfossarcoma.

Existe **evidência de nível 2-** de que os enfermeiros:

- Os enfermeiros estão entre os grupos profissionais mais afectados por problemas músculoesqueléticos;
- Os enfermeiros estão mais expostos a agentes patogénicos sanguíneos do que a restante população;
- Os enfermeiros estão em maior risco de adquirir Tuberculose (TB) quando comparados com a população em geral;
- Os enfermeiros, quando trabalham em enfermarias com doentes infectados com TB, têm maior risco de desenvolver TB comparativamente com os que não trabalham nestas enfermarias;
- As enfermeiras têm um excesso de mortalidade por cancro no geral, leucemia e cancro do pâncreas quando comparadas com as outras mulheres trabalhadoras;
- Existe um excesso de mortalidade por suicídio nas enfermeiras e os enfermeiros sofrem mais acidentes de origem ocupacional que não com cortopunçantes do que os restantes PCS (excepto internos) e outros grupos profissionais.

Existe **evidência de nível 3** de que os enfermeiros:

- Estão mais expostos ao vírus da hepatite B do que os médicos, estudantes de enfermagem e

administrativos;

- Não têm níveis de burnout diferentes dos restantes PCS.

Não se encontraram evidências sobre:

- Ocorrência de infecção por CMV, hepatite A ou C;
- Risco de cancro da mama nas enfermeiras comparativamente com as outras mulheres não enfermeiras;
- Risco de melanoma cutâneo, risco de cancro do fígado, pulmão, colo do útero, útero ou leucemia, ocorrência de HTA nos enfermeiros;
- Excesso de mortalidade por hepatite viral, cancro do cólon, cérebro, sistema nervoso, quedas acidentais ou morte relacionada com drogas nas enfermeiras em comparação com as mulheres trabalhadoras;
- Diferenças nas taxas de mortalidade por diabetes mellitus das enfermeiras e das mulheres trabalhadoras de colarinho branco;
- Ocorrência de alergias de origem ocupacional, obesidade, asma de origem ocupacional, problemas de sono e hábitos de sono, problemas cardiovasculares, saúde mental dos enfermeiros;
- Ocorrência de ansiedade, stress ou depressão nos enfermeiros;
- Ocorrência de acidentes com corto-perfurantes nos enfermeiros, absentismo nos enfermeiros, abuso de substâncias e ingestão de bebidas alcoólicas pelos enfermeiros;
- Prática de vacinação ou de exercício físico, auto-exame da mama, rastreio do cancro do colo do útero, hábitos tabágicos, consumo de medicamentos, hábitos alimentares, autopercepção do estado de saúde ou qualidade de vida e bem-estar dos enfermeiros.

Estudo dos Inquéritos Nacionais de Saúde de 1998/1999 e 2005/2006: auto-percepção do estado de saúde, morbidade, utilização dos serviços de saúde e despesas com a saúde e comportamentos relacionados com a saúde dos enfermeiros.

Os resultados obtidos em 1998/1999 e em 2005/2006 são bastante semelhantes. Em 1998/1999, não existia diferença na prevalência de doença aguda, doença crónica, incapacidade de longa duração ou IMC entre os enfermeiros, os outros PCS e os outros profissionais, nada levando a supor que em 2005/2006 os resultados seriam diferentes.

Há, nos enfermeiros e nos outros PCS, um claro predomínio dos indivíduos que percebem a

saúde como muito boa ou boa. Os dados de 1998/1999, demonstram que os outros profissionais,

quando comparados com os PCS, têm 52% maior possibilidade de perceberem o seu estado de saúde como razoável relativamente a percebê-lo como muito bom ou bom. Embora a pontuação média e a mediana da pontuação do *Mental Health Index* não sugira sofrimento psicológico provável, os enfermeiros são o grupo profissional com menor pontuação e, como tal, com saúde mental mais pobre. Tal é, de alguma forma, confirmado por uma maior prevalência de doença mental nos enfermeiros, comparativamente com os restantes grupos profissionais.

A realização de consulta de saúde oral nos 12 meses que antecederam o inquérito é diferente entre enfermeiros e outros profissionais. Os enfermeiros têm menor possibilidade de ter feito uma consulta de saúde oral nos 12 meses anteriores ao inquérito comparativamente com os não profissionais dos cuidados de saúde. Esta diferença encontrada em 1998/1999 provavelmente já não se verifica em 2005/2006 já que, neste período, a prevalência de consulta de saúde oral aumentou consideravelmente nos enfermeiros, passando a ser superior à verificada nos outros PCS.

Os enfermeiros têm menor possibilidade de terem consultado um médico nos 3 meses anteriores ao inquérito quando comparados com os outros profissionais. Os outros PCS têm, também, menor possibilidade de terem consultado um médico nos 3 meses que antecederam o inquérito quando comparados com os outros profissionais.

Os enfermeiros, outros PCS e outros profissionais não são diferentes no que concerne aos gastos com consultas de urgência ou outras, gastos com medicamentos ou outros gastos com a saúde nas duas semanas anteriores ao inquérito.

Conclui-se, também, que os enfermeiros, os outros PCS e os outros profissionais não diferem no consumo de medicamentos para dormir, no número de dias de toma destes medicamentos ou nos anos de toma.

Ser enfermeiro comparativamente com ter outra profissão que não dos cuidados de saúde diminui as chances de ser ex-fumador relativamente a nunca ter fumado em 42%.

Ser outro PCS que não enfermeiro, e comparativamente com os outros profissionais, aumenta as chances de ter consumido bebidas alcoólicas na semana anterior ao inquérito. Quer os enfermeiros quer os outros PCS tendem a não beber sozinhos, sendo mais frequente beberem em estabelecimentos comerciais. A percentagem de enfermeiros e outros PCS que ingeria bebidas alcoólicas antes de conduzir era menos de metade da dos outros profissionais.

Os enfermeiros, outros PCS e outros profissionais não diferiam relativamente à realização de actividade física pelo menos uma vez por semana.

A grande maioria dos enfermeiros estava a fazer algum método contraceptivo.

A menor percentagem de indivíduos a fazer contracepção verificava-se nos outros PCS. A vacinação contra a gripe era mais frequente nos enfermeiros.

Por seu lado, a realização de pelo menos uma citologia era mais frequente nos outros PCS e bastante superior nos enfermeiros e outros PCS do que nos outros profissionais. O mesmo acontecia relativamente à avaliação da tensão arterial.

Mortalidade nos enfermeiros e outros PCS entre Junho e Setembro de 2003

Entre Junho e Setembro de 2003 tinham ocorrido mais óbitos em mulheres enfermeiras do que nos homens com a mesma profissão. Já nos PCS como um todo, ou naqueles que não eram enfermeiros, existia maior proporção de mortes de indivíduos do sexo masculino.

Os PCS, considerados como um todo ou separadamente em enfermeiros e outros PCS, faleciam mais tarde do que os restantes profissionais. No entanto, para todos os grupos profissionais estudados a maior proporção de óbitos ocorria depois dos 74 anos de idade.

O mais frequente, em todos os grupos profissionais, era os óbitos de causa natural, no domicílio.

As duas principais causas de morte não diferiam entre PCS (todos, enfermeiros ou outros PCS) e outros profissionais, embora se verificassem alterações na posição (primeira ou segunda) de acordo com o grupo profissional. Já a terceira principal causa de morte variava entre os grupos estudados: nos PCS (e nos outros PCS) era as doenças do aparelho respiratório, nos enfermeiros as doenças do sistema nervoso e nos outros profissionais as doenças do aparelho circulatório, tumores, sintomas, sinais e resultados anormais de exames clínicos e de laboratório, não classificados em outra parte.

A análise de correspondências múltiplas veio, em parte, confirmar esta similitude. Permitiu identificar quatro perfis de mortalidade: dois determinados pelo tipo de óbito, o grupo etário e a causa de morte e dois definidos também

pelo grupo etário, causa de morte, estado civil e profissão (sem que, contudo, existisse um poder discriminatório das profissões dos cuidados de saúde).

Os PCS, comparativamente com os outros profissionais, apresentavam um excesso de mortalidade por doenças do sistema nervoso e um défice de mortalidade por doenças do aparelho geniturinário.

Os enfermeiros, por seu lado, quando comparados com os outros profissionais, tinham um excesso de mortalidade por doenças do sistema nervoso e um défice de mortalidade por doenças do aparelho respiratório e por sintomas, sinais e resultados anormais de exames clínicos e de laboratório, não especificados em outra parte.

Ao comparar a proporção de mortalidade por causa específica dos enfermeiros com a dos outros PCS verificou-se existir um excesso de mortalidade por algumas doenças infecciosas e parasitárias, doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas, doenças do sistema nervoso e causas externas de morbilidade e de mortalidade. Verificou-se, também, um défice de mortalidade por doenças do aparelho respiratório.

Os outros PCS, quando comparados com os outros profissionais, apresentavam um excesso de mortalidade por doenças do sistema nervoso e por doenças do aparelho respiratório e um défice de mortalidade por causas externas de morbilidade e de mortalidade.

DISCUSSÃO E RECOMENDAÇÕES

Das opções metodológicas

A revisão sistemática da literatura revelou-se um importante instrumento metodológico, útil e adequado no desiderato de responder à questão de investigação.

Tornou-se óbvio que a avaliação da qualidade do estudo é essencial para que, no final, se possa discernir sobre as evidências encontradas. A inexistência de *gold standards* para os estudos

observacionais levou a que se tivessem de estabelecer padrões específicos para esta revisão que se revelaram adequados ao problema em estudo e que permitiram, no final, estabelecer o nível das evidências encontradas. A opção pelo sistema SIGN de classificação das evidências mostrou-se adequada aos objectivos da revisão.

A análise dos 3º e 4º INS colocou vários desafios que resultaram do facto de ambos utilizarem um desenho amostral multietápico com probabilidades diferenciais das unidades amostrais que englobou estratificação, *clustering* e ponderação. Este tipo de amostragem implicou uma análise complexa que contemplou o efeito do desenho da amostra que só foi possível no caso dos dados do 3º INS.

Apesar das limitações que um estudo de mortalidade proporcional pode apresentar considera-se que, no presente caso, as vantagens superaram as desvantagens. Para além disso, foi possível, através dos resultados obtidos, discernir acerca das hipóteses estipuladas e, assim, contribuir para futuras linhas de investigação.

Da saúde dos enfermeiros

Determinantes

Em 1998/1999 ser enfermeiro, comparativamente com outra profissão que não dos cuidados de saúde diminuía a possibilidade de ser ex-fumador relativamente a nunca ter fumado o que pode reflectir a contribuição do conhecimento sobre os efeitos nocivos do tabaco para a tendência para não fumar.

Os outros PCS, comparativamente com os não PCS, têm maior possibilidade de terem consumido bebidas alcoólicas na semana anterior ao inquérito mas o

padrão de consumo não diferia. Os enfermeiros e os outros PCS consumiam menos bebidas ao almoço e ao jantar do que os outros profissionais. Por outro lado, também tendiam a beber menos sozinhos optando por beber em estabelecimentos comerciais (mas em menor percentagem do que os outros profissionais) ou em eventos desportivos. A percentagem de enfermeiros e de outros PCS que tinham ingerido bebidas alcoólicas antes de conduzir era cerca de metade da verificada nos outros profissionais.

De acordo com a RSL realizada, não existiam evidências sobre o consumo de medicamentos pelos enfermeiros. A análise dos INS revelou, igualmente, não existirem diferenças entre enfermeiros, outros PCS e outros profissionais no consumo de medicamentos para dormir, mesmo relativamente ao número de dias, nas 2 semanas anteriores ao inquérito ou o número de anos de toma.

De acordo com os dados do 4ºINS, os enfermeiros e os outros PCS tinham tomado mais medicamentos receitados nas duas semanas anteriores ao inquérito, sendo que nos enfermeiros a percentagem era cerca de 10% superior à dos outros PCS. Os resultados parecem indicar um provável acesso privilegiado dos PCS a medicamentos para os quais é necessário receita médica. Por outro lado, a baixa diferença na toma de medicamentos não receitados sugere que não existe um padrão muito marcado de auto-medicação o que seria de esperar num grupo profissional com um conhecimento terapêutico privilegiado.

A RSL demonstrou não existirem evidências sobre a prática de vacinação nos enfermeiros. A análise descritiva do 4º INS permitiu verificar que a percentagem de enfermeiros que já tinha, alguma vez, vacinado contra a gripe era superior à dos outros PCS ainda que fosse inferior à dos outros profissionais. Estes dados podem indicar um padrão diferente de vacinação contra a gripe nos enfermeiros.

A diferença encontrada na realização de pelo menos uma mamografia durante a vida entre as PCS e as outras profissionais pode, eventualmente, ser explicada pela diferença na idade das primeiras (mais novas) e das segundas. Na RSL não existiam evidências sobre a prática de mamografia.

A percentagem de mulheres PCS que já tinha feito pelo menos um rastreio do cancro do colo do útero era superior à verificada nas outras profissionais. Vários estudos demonstraram que os PCS parecem vigiar mais amiúde a sua saúde reprodutiva, nomeadamente, realizando rastreios do cancro do colo do útero e da mama mais frequentemente.

Os enfermeiros eram os que apresentavam maior percentagem de indivíduos a fazerem um método contraceptivo, seguiam-se os outros PCS e os outros profissionais. Poder-se-á colocar a hipótese que as diferenças observadas derivam da diferença de idade entre os grupos profissionais. A contracepção não foi estudada na RSL.

A percentagem de outros PCS e de outros profissionais que tinham avaliado a TA nos 3 meses anteriores ao 4º INS era inferior à dos enfermeiros. Achado idênticos aos descritos por outros autores.

Esta diferença poderá ser explicada pelo facto de a avaliação da TA ser uma actividade habitualmente realizada pelos enfermeiros (e por outros PCS) o que lhes facilitaria o acesso à mesma e lhes permitiria a auto-avaliação.

Em 1998/1999 os enfermeiros tinham menor possibilidade de ter feito uma consulta de saúde oral do que os outros PCS. No entanto, e mesmo tendo em conta as limitações de análise dos dados de 2005/2006, esta tendência parecia ter-se alterado.

Os enfermeiros tinham menor possibilidade de terem consultado um médico nos 3 meses anteriores ao INS comparativamente com os outros profissionais.

Tal pode indicar uma utilização “de corredor” dos serviços de saúde decorrente da proximidade com o médico e que se efectivaria em consultas informais.

Morbilidade

Com a análise dos INS, verificou-se que o perfil de morbilidade dos enfermeiros, outros PCS e outros profissionais, nas dimensões consideradas, não era diferente.

A inexistência de diferenças entre os grupos profissionais, encontrada a partir dos dados do INS, pode ser explicada por se ter agregado todas as doenças crónicas (diabetes, asma ou bronquite crónica, alergia, hipertensão arterial e lombalgias) numa só variável (doença crónica). Esta categorização pode ter mascarado prevalências superiores de doenças que se sabem estar associadas ao trabalho de enfermagem, como é o caso das lombalgias.

Não se verificaram diferenças entre os grupos profissionais relativamente ao valor médio de IMC após controlar para o efeito de potenciais confundimentos. Resultados semelhantes foram descritos por vários autores.

Os enfermeiros aparentavam ter estados mais pobres de saúde mental que os outros PCS mas melhores que os outros profissionais. Pode-se postular que a eventual diferença entre enfermeiros e outros PCS deriva da singularidade do cuidar em enfermagem, da atenção especial que o caracteriza.

Pode ser reflexo da complexidade emocional do trabalho em enfermagem.

Auto-percepção do estado de saúde

Verificou-se que os PCS, considerados como um todo, ou separadamente em enfermeiros e outros PCS, tendiam a perceber a saúde de forma mais positiva que os outros profissionais.

Vários autores referem como determinantes da auto-percepção do estado de saúde, o estado físico, a doença crónica, o estatuto sócio-económico e os estilos de vida. No estudo da auto-percepção do estado de saúde controlaram-se os efeitos destes determinantes. Contudo, as diferenças entre os grupos profissionais mantinham-se. A disponibilidade de serviços de saúde é um importante determinante da percepção do estado de saúde. Este factor não foi tido em conta o que poderá, eventualmente, explicar a variação obtida.

Outro factor não medido foi a saúde mental e outros factores psico-sociais como o apoio emocional, o stress e a auto-estima que influenciam, igualmente, a auto-percepção do estado de saúde.

Mortalidade

Três aspectos caracterizavam a mortalidade dos PCS: morriam mais tarde do que os não profissionais de saúde, tinham um défice de mortalidade na maioria das causas consideradas até aos 54 anos de idade, apresentavam um excesso de mortalidade por doenças do sistema nervoso e um défice de mortalidade por doenças do aparelho geniturinário.

Na base do défice de mortalidade podem estar diversos factores. Os PCS podem beneficiar dos seus próprios conhecimentos e, assim, terem estilos de vida mais saudáveis e comportamentos relacionados com a saúde que lhes permita viver mais tempo.

O trabalho no sector da saúde, e mais precisamente o trabalho dos PCS (enfermeiros e outros) era relativamente estável, seguro e não existia desemprego, nos restantes grupos profissionais existiriam profissões para as quais tal não se verificava. Assim, em algumas delas, os indivíduos poderão ter sido vítimas de desemprego ou de condições precárias de trabalho (subemprego) que, cumulativamente com outras desvantagens adquiridas ao longo da vida, podem ter influenciado fortemente a saúde do indivíduo e consequentemente, a sua morte.

O excesso de mortalidade por doenças do sistema nervoso nos PCS foi já descrito noutros estudos.

Uma das possíveis explicações pode advir dos PCS terem falecido mais tarde do que os indivíduos com outras profissões e, como tal, terem desenvolvido estas patologias devido a um processo natural de envelhecimento. Outra das explicações, e, neste caso especificamente para os enfermeiros, pode ter a ver com a elevada prevalência do sexo feminino.

Na presente investigação, detectou-se, também, um excesso de mortalidade por tumores nas mulheres PCS quando comparadas com as mulheres dos outros grupos profissionais. Este padrão mantinha-se quando se comparavam as enfermeiras ou as outras PCS com as restantes mulheres. O excesso de mortalidade por tumores mantinha-se nas enfermeiras quando se utilizava, como grupo de comparação, as outras PCS.

O conhecimento actual que existe sobre a etiologia dos tumores malignos está condicionado pela noção desta complexa teia de causalidade e pelos métodos epidemiológicos que são utilizados para a estudar.

Os profissionais dos cuidados de saúde, durante o seu exercício profissional são expostos a uma série de substâncias químicas entre as quais se encontram fármacos, gases anestésicos, agentes de limpeza e de esterilização, solventes, sabões e reagentes com potenciais efeitos mutagénicos, carcinogénicos e teratogénicos.

Os resultados obtidos com a presente investigação não justificam recomendações sobre intervenções. O conhecimento sobre a saúde dos enfermeiros e a influência que o trabalho de enfermagem tem sobre esta é, ainda, lacunar.

Assim, recomenda-se:

- O desenvolvimento de programas de vigilância de saúde dos enfermeiros e dos outros profissionais dos cuidados de saúde;
- A melhoria da declaração e codificação da profissão nos certificados de óbito;
- A análise sistemática das causas de óbito por grupo profissional;
- A criação de mecanismos de acesso aos dados dos Inquéritos Nacionais de Saúde que, sem colocar em causa o anonimato dos respondentes, permita a análise de dados exaustiva e inferencial.

MARTINS, Ana Fernandes (2010) Activity of compounds Isolated from *Carpobrotus edulis* on Efflux Pumps of Bacteria and Cancer Cells, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: Introdução: A resistência aos antibióticos é um grave problema de saúde quer em Portugal quer a nível mundial. Nos dias de hoje, uma grande percentagem dos isolados clínicos de bactérias Gram-negativas é multi-resistente (MR) e, sempre que estudado, o fenótipo MR é mediado pela sobre-expressão de bombas de efluxo (BE). A sobre-expressão de bombas de efluxo em bactérias resulta da exposição destas a um antibiótico que, por vários processos, lhes confere um fenótipo MR. Contudo, o processo pelo qual a estirpe bacteriana desenvolve resistência durante a terapia com determinado antibiótico, ainda não foi completamente demonstrado em laboratório. Frequentemente, o grau de resistência dos isolados clínicos é muitas vezes

superior à dose constante de antibiótico usada na terapia e atingida no plasma do paciente.

Entre as Enterobacteriaceae, a principal BE pertence à família RND, na qual a energia necessária ao efluxo provém da força proto-motriz (PMF). Factores do meio envolvente, tais como, cálcio, pH ou glucose (fonte de energia), têm extrema influência nos mecanismos de retenção ou efluxo de compostos pela célula. Contudo, uma vez que o invólucro celular é o primeiro componente bacteriano a enfrentar alterações das condições do meio onde a bactéria se encontra, tais como alteração da pressão hidrostática, osmolaridade ou pressão antibiótica, é essencial compreender a generalidade dos processos envolvidos na aquisição de resistência. Assim, é urgente compreender como é que as condições do meio influenciam a composição da membrana celular e os seus mecanismos de efluxo.

A primeira parte desta dissertação estuda o efeito dessas condições na composição da membrana externa e nas respostas celulares. Foi então estudado o efeito do *stress* provocado quer por aumentos crescentes na concentração de antibiótico, quer por passagens sucessivas da estirpe bacteriana em concentrações constantes de antibiótico, simulando o que acontece no paciente quando submetido a longos períodos de terapia com antibiótico.

Moduladores do efluxo podem ser usados em terapia, conjuntamente com os antibióticos, de modo a aumentar o seu efeito terapêutico. A sua utilização começa a ser aceite como uma nova abordagem terapêutica contra a multi-resistência. Deste modo a segunda parte desta tese foca a purificação e caracterização de compostos isolados da planta *Carpobrotus edulis*, cujo extracto metanólico mostrou, anteriormente, inibir BE bacterianas. Uma vez que foi já demonstrado existir uma relação entre BE de bactérias e de células cancerígenas, foi também estudado o efeito inibitório dos compostos purificados num dos transportadores com mais relevância em multi-resistência em células cancerígenas (P-gp).

Métodos: Foram utilizados métodos de extracção de proteínas e electroforese para estudar a composição da membrana externa de células bacterianas cujo crescimento ocorreu em dois meios diferentes: sólido e líquido. O efeito da pressão antibiótica na expressão de BEs foi estudada através do crescimento de estirpes bacterianas em concentrações crescentes de antibiótico ou mantendo-as em concentrações de antibiótico constantes por longos períodos de tempo. No final das sucessivas passagens foi estudada a resposta celular a diferentes antibióticos na presença de moduladores de efluxo bem como os níveis de expressão de BEs por RT-PCR em tempo real. O efeito de moduladores de efluxo tais como CCCP, PA β N, verapamil ou fenotiazinas e os efeitos do cálcio, pH e fontes de energia foram estudados pelo método semi-automático que segue a acumulação ou efluxo de brometo de etidium pelas células bacterianas, em tempo real, nas condições aplicadas ao meio do ensaio experimental.

O estudo das actividades *in vitro* dos compostos isolados de *C. edulis* em relação a estirpes de referência e outras multi-resistentes, que sobre-expressam determinadas BE, foi realizado por determinação das concentrações mínimas inibitórias dos compostos, bem como de outros antibióticos, aos quais as estirpes eram resistentes, na presença do composto. O método semi-automático atrás referido foi também utilizado no estudo destes compostos como moduladores de efluxo. A influência destes compostos na morte de estirpes bacterianas fagocitadas por macrófagos foi também estudada: ensaios *ex vivo*. Por fim, foi estudada a actividade antiproliferativa

dos compostos isolados em linhas celulares cancerígenas bom como a sua capacidade de inibição da P-gp responsável pela multi-resistência nessas linhas celulares.

Resultados: Durante este estudo foi observado que em meio líquido há maior expressão de uma proteína com 55kDa em oposição ao que acontece quando a bactéria cresce em meio sólido. A simulação da resposta bacteriana durante a terapia pelos dois processos descritos, mostrou que a resposta bacteriana é dependente do processo de adaptação seguido.

Os resultados desta dissertação sugerem, também, que o efluxo e a acumulação de EB por células de *E. coli* são dependentes do pH e de energia, os quais influenciam o desempenho da bomba de efluxo AcrAB. Esta BE depende da concentração periplasmática de prótons para a sua activação. O efluxo é independente do pH do meio onde as células bacterianas cresceram, contudo, é dependente do pH do ensaio, o que sugere que a bactéria é capaz de se adaptar a diferentes condições do meio tais como pH ou agentes prejudiciais à sua sobrevivência. Devido à sua capacidade quelante, o composto CCCP foi usado a diferentes pH com o objectivo de compreender o papel da concentração protónica e da PMF no efluxo. O uso de CCCP juntamente com variações no pH, possibilitou a identificação dos principais tipos de sistemas de efluxo que respondem às diferentes condições do meio. Contudo, o composto PA β N interfere com o efluxo de EB, por competição com este, pelo sítio activo da bomba de efluxo (um KM para esta competição foi determinado).

Os compostos isolados da planta *C. edulis* foram: ácido oleanólico, β -amirina, uvaol, catequina, epicatequina, MGDG e procianidina B5. Foi observado que estes compostos tinham diferentes actividades consoante o mecanismo de resistência característico de cada uma das estirpes em que a sua actividade foi estudada. Este facto está de acordo com os resultados obtidos para a resposta celular de bactérias, cuja multi-resistência foi obtida por diferentes mecanismos, perante o uso de moduladores. Os resultados obtidos sugerem que, de entre os compostos isolados, o composto uvaol foi o mais activo como modulador da actividade de efluxo, quer em células bacterianas quer em células cancerígenas. Também demonstrou uma actividade significativa contra *Staphylococcus aureus* intracelular.

Conclusão: Uma proteína de 55kDa foi anteriormente descrita como factor de virulência. A mesma proteína encontrava-se menos expressa em bactérias cultivadas na presença de uma fenotiazina, um composto descrito como modulador de efluxo. Deste modo a acção destes compostos como adjuvantes terapêuticos pode dever-se à sua capacidade de reduzir a virulência de determinada estirpe. Deste modo, os resultados obtidos, quando células bacterianas cresceram em meios líquido e sólido, são extremamente importantes pois podem indicar o motivo pelo qual infecções pelo mesmo organismo, mas por via de diferentes origens alimentares, apresentam diferentes graus de infecção e virulência para o paciente.

A adaptação induzida por passagens sucessivas em meio com a mesma concentração de antibiótico sugere a presença de genes “mutantes” cuja actividade possibilita a sobrevivência celular em condições de “stress”, reduzindo o consumo de energia. De outro modo este seria mais elevado devido à sobre-expressão dos sistemas de efluxo, tal como acontece quando a bactéria é sujeita a passagens em concentrações crescentes de antibiótico. Os resultados desta dissertação também sugerem que a activação do efluxo, mediado pela bomba de efluxo AcrAB, é dependente da concentração protónica no periplasma. Assim, quando células de *E. coli* experimentam

condições adversas causadas por agentes tóxicos, o efluxo é efectuado preferencialmente por transportadores do tipo ABC se o pH for maior que 7. O facto de o efluxo ser uma resposta independente do pH a que a estirpe cresceu, mas dependente do pH do meio em que o ensaio está a decorrer, sugere que a bactéria é capaz de se adaptar a diferentes pH do meio, tais como os que encontra durante o processo de infecção. Os mecanismos de efluxo dependentes de energia também variam com o pH. Deste modo a conjugação destes dois factores é muito importante para o estudo e compreensão da fisiologia e dos mecanismos de efluxo. As BEs que pertencem à família ABC têm uma função importante a pH 8, contudo a PMF é fundamental para o efluxo por via dos transportadores da família RND, como observado nos ensaios a pH 5. O uso de compostos que interferem com a PMF ou afectam directamente os sistemas de efluxo tem também um papel relevante no estudo dos mecanismos de efluxo e sua fisiologia.

Os resultados obtidos com os compostos purificados da planta *C. edulis*, sugerem que esta planta contém compostos promissores com actividade antibacteriana e anticancerígena. É importante salientar que a abundância desta planta na orla marítima de Portugal faz com que a produção em larga escala dos seus constituintes seja fácil, o que é um factor essencial no desenvolvimento de quaisquer produtos a usar na prática clínica.

RODRIGUES, Liliana Dias (2010) The role of the efflux mechanisms in multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: O aumento da tuberculose multirresistente e extensivamente resistente (TBMR e TBXDR) gerou um agravamento das preocupações por parte das autoridades de Saúde Pública em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define TBMR como tuberculose (TB) resistente pelo menos à isoniazida e à rifampicina, os principais fármacos de primeira-linha utilizados no tratamento da TB, enquanto que a TBXDR refere-se a casos de TB resistente não só à isoniazida e à rifampicina, mas também a uma fluoroquinolona e a pelo menos a um dos três fármacos de segunda-linha injectáveis canamicina, amicacina e capreomicina. A resistência em *Mycobacterium tuberculosis* deve-se principalmente à ocorrência de mutações espontâneas, à qual se segue a selecção de mutantes resistentes durante o tratamento. No entanto, algumas estirpes clínicas de *M. tuberculosis* resistentes não apresentam mutação em qualquer um dos genes que se sabe estarem associados à aquisição de resistência a um determinado fármaco, o que sugere que outro(s) mecanismo(s) deverão estar envolvidos no desenvolvimento de resistência, nomeadamente a presença de sistemas de bombas de efluxo que efectuam a extrusão do composto para o exterior da célula, evitando que o mesmo atinja o seu alvo. Um aumento da actividade de efluxo pode ocorrer devido a uma exposição prolongada a concentrações subinibitórias dos antibacilares, uma situação que pode resultar de uma terapia inadequada. A inibição da actividade de efluxo com um inibidor que não seja um antibiótico poderá restaurar a actividade de um antibiótico que seja

substrato de bombas de efluxo e desta forma consistir uma forma de aumentar a actividade dos actuais fármacos utilizados no tratamento da TB.

O trabalho descrito nesta dissertação tem como objectivo o estudo dos mecanismos de efluxo no desenvolvimento de multirresistência em *M. tuberculosis* e de como a resistência fenotípica mediada por bombas de efluxo se correlaciona com a resistência genética. De forma a alcançar este objectivo, foram desenvolvidos vários protocolos experimentais utilizando modelos biológicos, tais como *Escherichia coli*,

Mycobacterium smegmatis uma micobactéria de crescimento rápido e *Mycobacterium avium*, antes da sua aplicação ao estudo de *M. tuberculosis*. Esta abordagem permitiu o estudo dos mecanismos que resultam na adaptação fisiológica de *E. coli* à tetraciclina por exposição a concentrações subinibitórias deste antibiótico (Capítulo II), o desenvolvimento de um método fluorimétrico que permite a detecção e quantificação da actividade de efluxo (Capítulo III), a caracterização do transporte de brometo de etídeo em *M. smegmatis* (Capítulo IV) e a contribuição da actividade de efluxo para a resistência aos macrólidos no complexo *Mycobacterium avium* (Capítulo V). Por fim, os métodos desenvolvidos permitiram o estudo do papel das bombas de efluxo em estirpes de *M. tuberculosis* induzidas a resistência à isoniazida.

Assim, como descrito no Capítulo II, foi possível observar que a adaptação fisiológica de *E. coli* à presença de tetraciclina resulta de uma interacção entre mecanismos a nível genético e modificações pós-traducionais a nível da conformação de proteínas que diminui a permeabilidade da parede celular e aumenta a actividade das bombas de efluxo. Para além disso, o Capítulo III descreve o desenvolvimento de um método fluorimétrico semi-automático que permitiu correlacionar esta actividade de fluxo com a cinética de transporte do brometo de etídeo (um conhecido substrato de bombas de efluxo) em *E. coli* e também a identificação de inibidores do efluxo.

Relativamente a *M. smegmatis*, comparou-se a estirpe selvagem *M. smegmatis* mc2155 com mutantes "knockout" para LfrA e MspA, no que respeita à sua capacidade de transportar brometo de etídeo. Os resultados apresentados no Capítulo IV demonstraram que MspA, a principal porina de *M. smegmatis*, desempenha um papel importante na entrada de brometo de etídeo e antibióticos na célula e que o efluxo através da bomba LfrA está envolvido na resistência de baixo nível a estes compostos em *M. smegmatis*. O Capítulo V descreve o estudo da contribuição de bombas de efluxo na resistência aos macrólidos em estirpes clínicas do complexo *M. avium*. Demonstrou-se que a resistência à claritromicina sofreu uma redução significativa na presença dos inibidores de efluxo tioridazina, clorpromazina e verapamil. Estes inibidores também diminuíram o efluxo de brometo de etídeo e aumentaram a retenção de eritromicina marcada com ¹⁴C nestas estirpes.

Por fim, os métodos desenvolvidos com os modelos experimentais referidos acima permitiram o estudo do papel das bombas de efluxo em estirpes de *M. tuberculosis* induzidas à resistência à isoniazida. Este trabalho encontra-se descrito no Capítulo VI desta dissertação, onde se demonstra que a indução de resistência à isoniazida não resultou da ocorrência de mutações em qualquer um dos genes associados com a resistência a este fármaco, mas de um sistema de efluxo que é sensível a inibidores do efluxo. Estes inibidores provocaram a diminuição do efluxo de brometo de etídeo e também a redução da concentração mínima inibitória da isoniazida nestas estirpes.

Para além disso, a análise de expressão genética demonstrou a sobre-expressão de genes que codificam para bombas de efluxo nas estirpes induzidas comparativamente com as estirpes originais não induzidas.

Concluindo, o trabalho descrito nesta dissertação demonstra que as bombas de efluxo desempenham um papel importante no desenvolvimento de resistência, em particular nas micobactérias. Uma estratégia para ultrapassar a resistência mediada por mecanismos de efluxo poderia passar pela utilização de compostos que inibem a actividade de efluxo, restaurando a actividade de antimicrobianos que são substratos de bombas de efluxo, uma abordagem útil particularmente em TB em que os regimes de tratamento mais eficazes se estão a tornar ineficazes face ao aumento da TBMR/TBXR.

RODRIGUES, Louise Pereira (2010) Early detection of the biological and genetic determinants of resistance to artemisin based combination therapy in malaria parasites, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: A utilização de Terapia Combinada com Artemisinina (ACT), administração simultânea de derivados de Artemisinina (ART) com outros antimaláricos quimicamente distintos, representa atualmente o último recurso eficaz contra parasitas de malária humana resistentes a múltiplos fármacos. As vantagens da utilização de ACTs para o tratamento da malária foram debatidas em diversos estudos, baseando-se fundamentalmente na elevada eficácia e rápida acção dos derivados de ART associadas à utilização de fármacos de semi-vida longa, com o objetivo de complementar a curta semi-vida dos derivados de ART. No entanto, administração destes fármacos em níveis sub-terapêuticos, entre outros factores, contribuiu para o aparecimento de parasitas resistentes a cada componente da terapia combinada. O aparecimento de resistência a um dos componentes da combinação pode contribuir para o aparecimento de resistência aos ACTs em populações parasitárias. Adicionalmente, parasitas resistentes a cada um dos componentes dos ACTs podem sofrer recombinação genética em mosquitos vectores, o que poderia originar novas estirpes resistentes simultaneamente aos dois fármacos da combinação.

Com o objectivo de testar estas hipóteses e visando criar um modelo capaz de representar a possível evolução de resistência aos ACT em parasitas de humanos, o parasita de malária murina *Plasmodium chabaudi* foi utilizado neste estudo. Apesar de poderem não reflectir os mecanismos ocorrentes em *Plasmodium falciparum* com exatidão, os modelos murinos representam um excelente recurso para obter indícios relativos à biologia do parasita, nomeadamente, aos mecanismos de evasão à acção de fármacos. Além disso, podem ainda fornecer ferramentas necessárias para que a vida útil de um determinado fármaco seja avaliada e contribuir para o desenvolvimento de políticas apropriadas para cada país onde a doença é endémica.

No decorrer deste trabalho, a evolução experimental de resistência a versões de ACTs que consiste na combinação de artesunato e mefloquina (ATN + MF) foi obtida através de selecção por pressão de fármaco utilizando duas abordagens: i) o clone resistente a MF, AS-15MF, foi submetido a sub-inoculações consecutivas em murganhos tratados com doses crescentes de ATN; e ii) o clone resistente a ATN, AS-ATN, foi submetido a sub-inoculações consecutivas

em murganhos tratados com doses crescentes da combinacao ATN + MF. Em ambos os casos, os clones obtidos, AS-MFATN-5 e AS-ATNMF-1, apresentaram niveis acrescidos de resistencia a ATN + MF quando comparados aos seus progenitores AS-15MF e AS-ATN, respectivamente.

A analise genetica dos clones AS-MFATN-5 e AS-ATNMF-1 revelou que os mesmos haviam adquirido uma copia extra do gene *mdr1*, e que a aquisicao desta copia extra foi acompanhada

pelo aumento nos niveis de expressao de RNA e proteina no clone AS-ATNMF-1.

Adicionalmente, a re-sequenciacao do genoma completo do clone AS-ATNMF-1 atraves do metodo Solexa revelou a presenca adicional de duas novas mutacoes nao sinonimas nos genes PCAS_132020 e PCAS_143160, ambos de funcao desconhecida.

O clone AS-ATNMF-1 foi ainda comparado ao seu progenitor AS-ATN em ensaios de competicao intra-hospedeiro, com o proposito de avaliar um potencial custo biologico da resistencia a combinacao ATN + MF. Alem disso, o parasita AS-ATNMF-1 foi comparado com o clone AS-ATN sub-inoculado vinte e sete vezes em murganhos na ausencia de tratamento com farmaco (AS-ATN27P), com o objectivo de verificar se sub-inoculacoes consecutivas estariam associadas a um aumento no *fitness* destes parasitas. Nestes ensaios, enquanto o clone AS-ATNMF-1 foi capaz de superar o seu progenitor AS-ATN em termos de multiplicação parasitaria, esta mesma tendencia nao foi observada quando em competicao com AS-ATN27P.

Colectivamente, os resultados descritos neste trabalho sugerem que a amplificacao do gene *mdr1* desempenha um papel importante na resistencia a ATN + MF gerada neste modelo experimental. No entanto, mutacoes adicionais podem tambem ter algum papel nesse fenotipo.

Adicionalmente, a presenca destas mutacoes nao esta associada a uma reducao no "fitness" do clone resistente AS-ATNMF-1 quando comparado ao progenitor sensivel a ATN + MF.

Em conclusao, a eficacia do tratamento baseado em ACTs pode ser comprometida pelo aparecimento de parasitas portadores de um mecanismo generico de evasao a aççao farmacologica, que previna a actuacao dos dois componentes da combinacao em simultaneo.

Alem disso, parasitas resistentes podem nao apresentar reducao no "fitness", o que poderia contribuir para o seu rapido alastramento.

Os resultados apresentados neste trabalho e a suas implicacoes inerentes poderao servir de base para o aperfeicoamento das terapias utilizando combinacoes de farmacos e das ferramentas moleculares para a monitorizacao da eficacia dos ACTs em populacoes parasitarias selvagens.

Resumo: A malária constitui um grave problema de saúde pública na República Democrática de Timor Leste (RDTL), caracterizada por ser uma doença endémica em todos os distritos, com as mais elevadas taxas de mortalidade e morbidade nas crianças e mulheres grávidas. Desde a independência em 2002, o número de casos da malária tem vindo a aumentar e a inexistência de dados epidemiológicos e poucos estudos ligados à resistência aos antimaláricos alertaram para a necessidade de actualizar o conhecimento da situação, com o objectivo de fomentar uma política de intervenção no domínio da vigilância e controlo da malária no país. Deste modo, este trabalho teve como finalidade avaliar a frequência da malária em cada distrito estudado, identificar e caracterizar os factores causais da sua

distribuição e os diversos factores socio-económicos envolvidos na transmissão e determinar a prevalência de mutações nos genes *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* em *Plasmodium falciparum* e *pvdhfr* e *pfdhps* em *Plasmodium vivax*, responsáveis pela resistência aos fármacos oficialmente em uso no país.

Neste contexto, foi efectuado um estudo epidemiológico onde foram colhidas amostras sanguíneas por Busca Passiva (BP) nos Hospitais/Clínicas e Busca Activa (BA) em domicílios individuais, distribuídos por seis distritos da RDTL, nos quais se pesquisou posteriormente a presença dos parasitas *P. falciparum* e *P. vivax*, recorrendo as duas técnicas laboratoriais distintas: microscopia óptica e *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Relativamente aos resultados obtidos no levantamento epidemiológico, a frequência e a distribuição da malária observada na população traduzem uma prevalência de 25,8% (112/434, na BP) e 5,1% (11/216, na BA), tendo-se observado maior prevalência nos grupos etários com menos de 14 anos de idade em relação aos indivíduos com idade superior ou igual aos 15 anos de idade. Verificou-se maior predomínio de infecção no sexo masculino relativamente ao sexo feminino. Adicionalmente, confirmou-se que várias características socio-económicas estão associadas à ocorrência de malária, tais como: tipo e condições precárias de habitação, criação de animais junto das habitações, trabalho/ocupação que expõe mais ao contacto com o mosquito vector. Por outro lado, os indivíduos que não utilizam redes mosquiteiras como protecção têm maior probabilidade de se encontrarem infectados. A proporção dos indivíduos com infecção da malária entre as zonas de residência foi analisada e comparada, não tendo sido demonstradas diferenças significativas, o que possibilitaria acções semelhantes a implementar para o controlo da malária no País.

No que respeita à pesquisa de mutações em genes de plasmódio previamente apontados como moduladores de fármaco-resistência, foram detectadas elevadas prevalências de alelos mutantes em ambas as espécies, *P. falciparum* e *P. vivax*, sugerindo que a resistência pode ser igualmente prevalente. Neste âmbito, realça-se a observação de que um grande número de amostras de *P. falciparum* (82,5%) era portador de 4 mutações distribuídas pelos genes *dhfr* e *dhps*, padrão este previamente associado à falência terapêutica com sulfadoxina-pirimetamina (SP).

Adicionalmente, demonstrou-se a existência da mutação *pfcr1* K76T, associada à resistência à cloroquina, em todos os isolados analisados, demonstrando que a mesma atingiu a fixação. Relativamente às amostras de *P. vivax*, a prevalência dos alelos mutantes 58R e 117N no gene *pvdhfr* foi de 79% e 81,6%, respectivamente, enquanto que 73,7% dos parasitas continham ambas mutações em simultâneo (“duplos mutantes”). Colectivamente, conclui-se que utilização continuada dos fármacos cloroquina e SP poderá contribuir para o contínuo aumento de mutações nos genes supracitados e consequente ineficácia clínica dos mesmos no tratamento do *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*.

Em conclusão, a detecção da prevalência dos polimorfismos genéticos de resistência constitui uma ferramenta acessória de fármaco vigilância e a identificação de características sócio-económicas envolvidas na transmissão da malária permitirá a elaboração e implementação de campanhas melhoradas de prevenção e/ou controlo da malária na RDTL.

ALMEIDA, Afonso (2009) Estudos epidemiológicos e resistência aos antimaláricos em Timor Leste, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

(Não contém resumo)

BORGES, Sofia Trindade (2009) Identification of genes determining mefloquine resistance in malaria parasites, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: Malaria is by far one of the most severe public health problems worldwide, devastating the lives of millions of people each year. The extensive use of antimalarial drugs such as chloroquine and mefloquine, has led to the acquisition of drug resistance by *Plasmodium falciparum*, severely curtailing global efforts to control malaria. For this reason, much hope is now laid on new therapeutic approaches based on the use of artemisinin-based combination therapies (ACTs), which include mefloquine-artesunate, amodiaquine-artesunate and lumefantrine-artemether. A better understanding of the underlying mechanisms of drug resistance is therefore imperative to slow or circumvent the evolution of resistance, to prolong the life span of the current drugs and to develop new drugs.

In this context, genetic and genomic tools were applied here to the rodent malaria model *Plasmodium chabaudi*, to exploit the genetic determinants of resistance to different component drugs of ACTs.

First, the uncloned progeny of a genetic cross between a mefloquine-resistant mutant (AS-15MF) and a genetically distinct sensitive clone (AJ) was selected with an optimized dose of mefloquine. The progeny obtained was then backcrossed here with AJ and the resulting product analysed by Linkage Group Selection (LGS) to define the signatures of selection arising after treatment with chloroquine (CQ), mefloquine (MF), lumefantrine (LM) or artemisinin (ART). Additionally, the critical genome-wide changes accumulated in AS-15MF were identified by Solexa whole genome re-sequencing.

Results showed that MF, LM and ART selected parasites bearing a duplicated segment on chromosome 12 which has translocated onto chromosome 4. Solexa sequence read-coverage analysis showed that this duplicated fragment extends for >392 kb and contains about 112 genes, including *mdr1*, the gene encoding the multi-drug resistance P-glycoprotein. The translocated fragment was precisely mapped on chromosome 4. MF and ART also generated selection signatures on chromosome 2, containing a mutation in a deubiquitinating enzyme, encoded by the *ubp1* gene. Unambiguous evidence is thus provided for the first time to demonstrate that resistance to chemically distinct components of ACTs share the same underlying genes, highlighting a possible limitation of these therapies.

Furthermore, a single mutation, unique to AS-15MF, was identified in a gene encoding a putative lysine decarboxylase. This mutation is not markedly selected by MF and it does not segregate with MF responses in the progeny clones of the genetic cross between AS-15MF and AJ, implying that it is not directly associated with the MF resistance phenotype.

COSTA, João Borges (2009) Infecções sexualmente transmissíveis em adolescentes prevalência e associação com factores sócio demográficos, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

As infecções sexualmente transmissíveis (IST) são um problema crescente de saúde pública mundial, com maior incidência em adultos jovens e adolescentes. Estas infecções, apesar da morbidade e mortalidade associada, são frequentemente negligenciadas ou abordadas apenas na prevenção da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH).

Portugal é o país da Europa ocidental com a maior prevalência de infecção pelo VIH e o segundo na incidência de gravidez na adolescência. O sistema de notificação português de doenças sexualmente transmissíveis é clínico, predominando a subnotificação e a não recolha de informação que permita interpretar tendências epidemiológicas ou rastrear grupos específicos.

O estudo efectuado teve como objectivos a averiguação da prevalência de IST, pesquisa das associações entre estas e factores sócio-demográficos ou morbidade materno-fetal e estudar a adesão dos parceiros ao tratamento, em 403 adolescentes, grávidas e não grávidas, observadas nos dois maiores centros de ginecologia-obstetrícia de Lisboa, entre 2005 a 2007. A pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e de *Neisseria gonorrhoeae* foi efectuada por reacção em cadeia da polimerase (PCR) em urinas e exsudados cervicais e a recolha de variáveis sócio-demográficas obtida por inquérito preenchido por profissional de saúde. Posteriormente, pesquisou-se também nos processos clínicos disponíveis dos recém-nascidos das adolescentes grávidas a existência de morbidade materno-fetal.

A infecção por *C. trachomatis* foi diagnosticada em 10,4% das adolescentes e por *N. gonorrhoeae* em 4,2%, com 1,2% de coinfeção. Estas infecções foram assintomáticas, respectivamente em 60 e 53% das adolescentes. Os exsudados cervicais, apesar de uma boa concordância com as urinas, tiveram maior número de resultados positivos para estas duas bactérias.

A tricomonose foi diagnosticada em 1% das adolescentes, a hepatite B em igual percentagem e não se diagnosticou infecções pelo VIH, hepatite C ou sífilis.

A prevalência de *C. trachomatis* e de *N. gonorrhoeae* na população estudada está de acordo com as prevalências descritas em adolescentes de outros países. Estas percentagens, sobretudo as de *C. trachomatis*, justificam o rastreio destas IST nesta faixa etária, conforme defendido por várias entidades europeias e internacionais.

As urinas, pela sua maior facilidade de obtenção são habitualmente utilizadas para rastreio, mas poderão ter mais resultados falsos negativos por inibição da técnica de PCR, sobretudo em grávidas, como se observou no nosso estudo. A colheita do exsudado cervical tem maior sensibilidade e a sua realização é também uma oportunidade para a pesquisa de outras IST e esclarecimento de dúvidas das adolescentes.

No estudo de associações significativas destas infecções com variáveis sócio-demográficas salientou-se a associação entre a infecção por *C. trachomatis* e a maior idade dos parceiros, o que pode explicar a prevalência elevada de IST observada em adolescentes com início recente da actividade sexual e média de apenas um parceiro no último ano.

As adolescentes grávidas tiveram significativamente menor escolaridade obtida, menor uso regular do preservativo, maior desemprego e exclusão do

sistema de ensino, com consequências sócio-económicas futuras para a jovem mãe e filho. Esta baixa escolaridade, consequência do marcado abandono escolar em Portugal, pode comprometer a eficácia de programas de rastreio e controlo de IST com base nas escolas. É assim importante sensibilizar os profissionais de saúde para a promoção do uso do preservativo, porque na população estudada e à semelhança dos dados nacionais, observou-se uma elevada prescrição da pílula e um reduzido uso do preservativo.

Na pesquisa de associações entre agentes de IST e a morbilidade materno-fetal foi possível observar que a infecção gonocócica esteve associada à morbilidade materna. Na população estudada observou-se também uma associação entre o baixo peso no nascimento e a infecção materna por *N. gonorrhoeae* e/ou *C. trachomatis*. Em contraste com as recomendações europeias ou internacionais, a infecção por *C. trachomatis*, a que tem maior associação à adolescência, não é notificada ou pesquisada sistematicamente em Portugal na gravidez. O estudo efectuado, com as limitações referentes à amostragem e número de adolescentes, reforça a importância da pesquisa de IST em adolescentes do sexo feminino, sobretudo em grávidas, grupo que sofre desproporcionalmente as consequências destas infecções.

CRAVEIRO, Isabel Rodrigues (2009) Mulheres em idade fértil e pobreza: formas de acesso e padrões de utilização de saúde reprodutiva, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.

Resumo: Esta tese aborda as práticas e as representações de mulheres em idade fértil, que vivem em contextos sociais de pobreza. As práticas sobre o acesso e as formas de utilização dos cuidados de saúde reprodutiva. As representações das mulheres relativamente à maternidade e/ou fecundidade, verificando de que forma estas influenciam a utilização de cuidados de saúde reprodutiva (saúde materna e planeamento familiar). E as representações dos profissionais de saúde e técnicos de serviço social sobre os comportamentos de fecundidade e as formas como as mulheres (pobres e não pobres) utilizam os cuidados de saúde reprodutiva.

Devido à natureza do objecto de estudo e à complexidade inerente, optou-se por utilizar uma combinação de métodos qualitativos e quantitativos e respectivas técnicas de recolha e análise de dados, num mesmo desenho de estudo, tendo em vista a triangulação metodológica, que ajudou à compreensão mais profunda da realidade em estudo. Como tal dividiu-se a investigação em três estudos: 1) o estudo exploratório; que apoiou nas decisões, nomeadamente na delimitação do objecto de estudo, dos objectivos gerais e específicos, das hipóteses centrais de investigação e dos aspectos metodológicos relacionados com o estudo de caso-controlo e o estudo qualitativo; 2) o estudo de caso-controlo (quantitativo); 3) o estudo qualitativo.

Estudo de caso-controlo

O estudo de caso-controlo foi realizado com mulheres em idade fértil, em que os casos são mulheres consideradas “muito pobres”, havendo dois controlos para cada caso: os controlos 1, que são mulheres consideradas “pobres” e os controlos 2, que são mulheres consideradas “não pobres”.

Este estudo foi planeado com uma amostra de 1513 mulheres em idade fértil, com 499 casos seleccionados segundo um esquema de amostragem estratificada proporcional (de mulheres consideradas muito pobres) seleccionados da base de dados de beneficiários de RSI, da SCML. E 1014 controlos (de mulheres não consideradas como muito pobres): os controlos 1 foram seleccionados também segundo um esquema de amostragem estratificada proporcional dos restantes beneficiários da SCML; os controlos 2 foram seleccionados de forma bi-etápica, primeiro procedeu-se a uma amostragem aleatória simples de quatro Centros de Saúde e de seguida optou-se por uma regra sistemática de selecção das utentes desses Centros de Saúde, mediante a aplicação de um formulário de critérios de inclusão. Os dados foram recolhidos através de um questionário semi-quantitativo aplicado por entrevista. Responderam ao questionário um total de 1054 mulheres, sendo que o total de respondentes distribui-se pelos grupos em estudo, isto é, 304 referentes aos casos (muito pobres), e 750 respeitantes aos controlos [293 pertencentes ao grupo de controlos 1 (pobres) e 457 provenientes do grupo de controlos 2 (não pobres)].

Os dados foram analisados utilizando técnicas estatísticas bivariadas e multivariadas. Concretamente, começou-se pela análise descritiva (frequências absolutas e relativas; medidas de tendência central: moda, média, mediana, média aparada a 5%) das variáveis demográficas e das variáveis de fecundidade (representações, tensões, práticas e controlo de fecundidade) em função das variáveis de condição social (gradientes de pobreza segundo os grupos em estudo).

Seguiu-se a análise de comparação e associação - o teste de Qui-quadrado para testar a homogeneidade e para testar a homogeneidade de variâncias aplicou-se o teste de Levene e a normalidade da variável quantitativa, nos grupos em estudo, foi testada através do teste de Kolmogorov Smirnov e o teste de Shapiro-Wilk. Sempre que as condições de aplicação da ANOVA não se verificaram, aplicou-se a alternativa não paramétrica: o teste de Kruskal-Wallis.

O cálculo do *odds ratio* da variável “ter gravidez e filhos” foi efectuado de acordo com o proposto por Mantel-Haenszel aplicado nas situações em que existem dois controlos por caso.

Foram ainda utilizados modelos de regressão logística (pelo método *Forward: LR*) para avaliar a probabilidade de ser do grupo de casos (muito pobre), relativamente a ser do grupo de controlos 1 (pobre) e ser do grupo de controlos 2 (não pobre). E dois modelos de regressão logística multinomial para estudar a relação entre uma variável dependente de resposta qualitativa não binária [no presente estudo com três classes - os três grupos em estudo: casos (muito pobres), controlos 1 (pobres) e controlos 2 (não pobres)] e um conjunto de variáveis explicativas (*predictor variables*), que podem ser de vários tipos.

A análise efectuada confirma a existência de gradientes de pobreza e a sua associação a gradientes de fertilidade, que se reflectem em termos de acesso à saúde e nos padrões de utilização de cuidados de saúde reprodutiva. O facto de as mulheres terem tido filhos (variável “ter gravidez e filhos”) aumenta a probabilidade (OR=1,17; $p<0,001$; IC = 1,08 – 1,26) de serem muito pobres, comparativamente a serem pobres e não pobres. Isto é, a maternidade configura-se como um factor explicativo da pertença social das mulheres, sobretudo quando interligado com outros factores. Concretamente, verifica-se através da análise dos modelos de regressão logística que existe uma interligação entre a condição social das mulheres e um conjunto de características sócio-demográficas, que se configuram como factores de risco

de pobreza, como sejam o baixo rendimento dos agregados, a dimensão dos agregados familiares, a baixa escolaridade e as pertenças étnicas.

Quanto ao acesso económico, constata-se que as mulheres muito pobres apresentam incapacidades financeiras para comportar custos com a compra de medicamentos muito superiores às restantes, constituindo-se esta como uma característica forte para explicar a sua condição social actual.

Em termos de utilização de cuidados de saúde reprodutiva percebe-se que as mulheres muito pobres são caracterizadas por baixa frequência das consultas de revisão do parto, com todas as eventuais implicações no seu estado de saúde.

Um aspecto pertinente prende-se com a sistemática aproximação das mulheres pobres às muito pobres, distanciando-se em quase tudo das mulheres não pobres. Ou seja, existe um número considerável da nossa população “média” com vulnerabilidades, que deveriam merecer uma atenção prioritária em termos de políticas sociais (nomeadamente, na área da saúde, do trabalho e do apoio social).

Assim, é de enfatizar a importância de haver uma adequação das políticas de saúde no sentido de assegurar que as populações mais vulneráveis consigam utilizar de forma apropriada os cuidados de saúde reprodutiva.

Estudo Qualitativo

Foi efectuado um estudo qualitativo, através de realização de entrevistas e grupos focais. Concretamente, foram feitas oito entrevistas e dois grupos focais a mulheres provenientes de diferentes contextos socioeconómicos (pobreza e não pobreza), num total de 18 indivíduos. Foram conduzidos dois grupos focais a profissionais de saúde (enfermeiros e médicos), num total de 15 participantes. E realizados quatro grupos de discussão a técnicos de serviço social, num total de 36 participantes. Todas as entrevistas e grupos focais foram gravados, seguindo-se a sua transcrição integral. Os dados foram analisados com base nos procedimentos de análise de conteúdo habituais no âmbito de abordagens qualitativas. No que diz respeito aos grupos focais, procedeu-se a uma análise categorial temática.

Através da análise das representações de fecundidade percebe-se que para as mulheres, independentemente do grupo socioeconómico a que pertencem, o melhor e o pior dos filhos, envolve três níveis: os sentimentos, o desempenho das funções parentais e as privações. E a maioria das mulheres assume que foi através de amigos, dos media e/ou de vizinhos que obteve as primeiras informações sobre os métodos contraceptivos. Revelando ainda a inexistência de influência familiar, especialmente das mães, na transmissão desses conhecimentos e informações sobre contracepção, em todos os grupos socioeconómicos. Aliás, a percepção generalizada é de que o sexo foi um assunto tabu na educação destas mulheres. Muitas das mulheres no estudo descrevem uma preparação inadequada para o sexo e contracepção na primeira gravidez, acontecendo esta como resultado de impreparação e não de planeamento.

Encontram-se semelhanças entre as mulheres provenientes de diferentes gradientes sociais, mas também se encontram diferenças, nomeadamente, acerca do papel do parceiro masculino no planeamento familiar e no planeamento das gravidezes. Existe uma diferença entre mulheres provenientes de grupos socioeconómicos distintos (muito pobres e pobres vs. não pobres) relativamente ao papel do parceiro na contracepção: não utilização do preservativo porque companheiros “não aceitam” vs. as mulheres que assumem que as decisões quanto à contracepção são e foram sempre da sua responsabilidade.

Os resultados vêm mostrar a importância atribuída ao sexo do médico e a vergonha envolvida na utilização dos cuidados de saúde materna, cujas consequências se revelaram impeditivas de realização das consultas pós-parto. Vários estudos já apontaram o desconforto durante o encontro biomédico nos cuidados pré-natais resultando de uma incapacidade da mulher para lidar com certas características do profissional de saúde, que podem incluir idade, género e linguagem (cfr. nomeadamente, Whiteford e Szelag, 2000). Um outro aspecto em que há diferenças entre grupos socioeconómicos nos resultados do estudo de caso-controlo, e que vem ser ainda mais aprofundado através do estudo qualitativo, está relacionado com os apoios recebidos quando os filhos nascem e quando existe uma situação de doença. As mais pobres encontram-se numa posição de vulnerabilidade acrescida, porque não podem colmatar a falta de apoios, por exemplo com amas para tomar conta dos filhos, como é admitido, por exemplo, por uma mulher de etnia cigana. Mas emerge uma semelhança entre as mulheres dos diferentes grupos socioeconómicos, quando reivindicam a necessidade de existir mais apoio, nomeadamente uma rede de creches.

Os profissionais (saúde e social) demonstram nas suas representações as influências do modelo biomédico de saúde. Quanto às mulheres, consoante o seu contexto cultural, elas tendem a integrar num “modelo próprio” a sua relação com os cuidados de saúde, especificamente com os cuidados pré-natais. Modelo esse que não exclui o uso dos serviços biomédicos durante a gravidez, o que acontece é que as mulheres conservam as suas crenças e algumas práticas tradicionais em face de novas. Deixando em aberto a possibilidade de negociação e transmissão de conhecimentos por parte dos profissionais de saúde, processo facilitado com existência de diálogo e abertura dos profissionais de saúde para as especificidades culturais (cfr. outros estudos, nomeadamente, Atkinson e Farias, 1995; Whiteford e Szelag, 2000).

Os profissionais atribuem ao “pobre” uma característica-tipo: o imediatismo. Este condiciona a actuação dos indivíduos “pobres” nas práticas de planeamento familiar e nas formas de utilização de cuidados de saúde reprodutiva. Por exemplo, para os profissionais de saúde e técnicos de serviço social a utilização correcta da contracepção dependerá do nível educacional da mulher.

Mas não se comprova tal facto nos estudos, havendo mesmo indício de uma certa transversalidade nas “falhas” de utilização, por exemplo da pílula. Através do estudo de caso-controlo comprova-se que a pílula era o contraceptivo mais usado no momento em que as mulheres engravidaram do último filho, sendo que aparentemente algo terá falhado (dosagem, esquecimento, toma simultânea de antibiótico), não existindo diferenças entre os grupos socioeconómicos.

A análise reflecte a existência de representações nem sempre coincidentes entre mulheres e profissionais de saúde, no que diz respeito à maternidade, à gravidez e à fecundidade, mas também às necessidades e formas de utilização dos cuidados de saúde reprodutiva (saúde materna e planeamento familiar). Chama-se a atenção para a importância dos decisores terem estes factos em atenção de forma a adequar as políticas de saúde às expectativas e percepções de necessidade por parte das populações vulneráveis, procurando atingir o objectivo de utilização adequada de cuidados de saúde reprodutiva e, em última análise, promover a equidade em saúde.

Conclusões Gerais

Esta investigação insere-se numa lógica de perceber as características associadas no continuum de pobreza, procurando-se os factores que explicam a posição relativa dos grupos nesse mesmo continuum.

Em termos de saúde, constata-se existir uma associação entre a não realização de consultas de revisão do parto e as chances superiores de pertencer a um grupo socioeconómico mais pobre. Haverá aqui lugar a um cuidado acrescido em termos de organização de cuidados de saúde para que estas mulheres, com vulnerabilidades de várias ordens, sejam devidamente acompanhadas, orientadas, apoiadas para a realização deste tipo de consultas, envolvendo uma sensibilização para “gostar de si própria”, de valorização individual, mesmo depois do nascimento dos filhos.

As redes de sociabilidade são distintas consoante a posição que a mulher ocupa em termos de gradiente social, sendo que a posição é mais vulnerável para as mulheres muito pobres e pobres, quer em situação de doença, quer em situação de apoio para os filhos e ainda em termos de privação material existe um efeito em termos de diluição das sociabilidades para grupos já tão fragilizados a outros níveis.

Ao descrever, analisar e caracterizar os gradientes de pobreza e privação múltipla entre os grupos de mulheres em estudo posso concluir que existem aspectos diferenciadores das mulheres pobres relativamente às mulheres não pobres. Mas elas manifestam sobretudo características que as aproximam das mulheres muito pobres. Ou seja, este grupo de pessoas está particularmente envolto numa multiplicidade de riscos sociais, uma vez que são mulheres que têm filhos, trabalham, têm redes de sociabilidade enfraquecidas e não podem contar com a ajuda do Estado em termos de medidas de apoio social, não sendo elegíveis, por exemplo, para o RSI. Urge rever as condições de atribuição de medidas, não necessariamente com a configuração actual, mas que tenham em atenção este conjunto populacional. A actividade sexual começa muito cedo nas vidas das jovens, independentemente da proveniência socioeconómica, pelo que esse é um aspecto que, penso, deverá continuar a ser considerado em termos de saúde sexual e reprodutiva por parte das diferentes entidades no que se refere à educação e promoção para a saúde.

As questões relacionadas com a incapacidade para comportar custos de saúde - deixar de comprar medicamentos, sobretudo, para as próprias mulheres, não poder pagar consultas em médicos especialistas e dentistas - revelam-se sérias, na medida em que fazem emergir as diferenças em termos de grupos socioeconómicos, constituindo-se como um factor associado com as iniquidades em saúde ainda existentes em Portugal. Como é sabido pelos estudos realizados, estas são também causas de pobreza. Assim, esta é uma das áreas a merecer actuação prioritária no sentido de contribuir para que caminhemos para uma sociedade com mais equidade.

A existência de diferenças na acessibilidade e no acesso geográfico e económico, marcada pelas diferenças em termos de gradientes sociais, deixa em aberto a necessidade de actuar no sentido de que o sistema de saúde tenha políticas de promoção da equidade, nomeadamente a equidade de acesso económico, na investigação desenvolvida sobre “sistemas de saúde”.

Parece que fica evidente a necessidade de monitorizar quais as interações entre as políticas, de saúde e sociais, e a variabilidade nas desigualdades sociais ao longo do tempo, ou seja, a importância de monitorizar os efeitos das políticas nos grupos vulneráveis. Só avaliando poderemos saber se as medidas devem continuar com conteúdo e formas de implementação actuais ou se, pelo contrário, deverão acontecer mudanças nas medidas de apoio para melhorar as condições sociais e de saúde das populações.

FIGUEIREDO, Cristina Furtado (2009) Transmissão recente da infecção pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* na região de saúde de Lisboa e Vale do Tejo em 2003. Contributo epidemiológico, Dissertação de Doutoramento no ramo de Saúde Internacional, especialidade Políticas de Saúde e Desenvolvimento. IHMT. Lisboa.

RESUMO

Introdução

Em Portugal, são raros os estudos que avaliam a frequência e os factores de transmissão da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Com a finalidade de contribuir para um melhor conhecimento sobre a transmissão recente da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, realizou-se um estudo de base populacional sobre a diversidade molecular de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*, isoladas de indivíduos residentes na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo em 2003, que permitiu responder a algumas questões sobre o padrão de transmissão da infecção da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* e sobre os factores demográficos, sócio-comportamentais e clínicos associados a essa transmissão.

Objectivos

Com este trabalho pretendeu-se:

- 1) Avaliar a sensibilidade dos sistemas de vigilância epidemiológica dos casos incidentes por tuberculose;
- 2) Caracterizar a epidemiologia da tuberculose e analisar a correlação entre a incidência observada e os indicadores demográficos, clínicos e de desenvolvimento concelhio respectivos;
- 3) Identificar os factores demográficos, sócio-comportamentais e clínicos associados aos padrões de susceptibilidade aos antituberculosos de 1.^a linha;
- 4) Caracterizar a diversidade molecular das estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*, identificar os factores demográficos, sócio-comportamentais e clínicos associados, bem como analisar a correlação entre a incidência observada e a frequência de agrupamentos moleculares.

Material, População e Métodos

Foi utilizado um modelo de estudo observacional, transversal ou ecológico, com uma componente analítica.

A população em estudo incluiu todos os indivíduos com tuberculose diagnosticada em 2003, residentes na Região de Lisboa e Vale do Tejo, e notificada a pelo menos uma das três fontes de dados de morbilidade por tuberculose em Portugal (Sistema de Vigilância da Tuberculose (SVIG-TB), Doenças de Declaração Obrigatória (DDO) e Sistema de Vigilância da Resistência aos Antibacilares (VigLab-Tuberculose). Sob esta população, e para responder aos objectivos propostos, o projecto de investigação foi dividido em quatro partes.

Na 1.^a parte, a avaliação da sensibilidade dos sistemas de vigilância foi realizada através da técnica de captura-recaptura, aplicada às três fontes de dados mencionadas e utilizando modelos log-lineares.

Na 2.^a parte, a descrição das características demográficas, sócio-comportamentais e clínicas da população em estudo foi feita através do cálculo de frequências absolutas e relativas e recorreu-se ao teste de homogeneidade do qui-quadrado para comparar as distribuições destas características por distrito de residência. Para a análise da correlação entre as taxas de incidência por concelho de residência e os indicadores demográficos, clínicos e de

desenvolvimento concelho respectivos, recorreu-se ao coeficiente de correlação linear de Pearson e à aplicação de modelos de regressão linear múltipla.

Na 3.^a parte, a análise univariada entre os padrões de susceptibilidade aos antituberculosos de 1.^a linha e os factores demográficos, sócio-comportamentais e clínicos em estudo foi efectuada pelo teste de qui-quadrado e teste exacto de Fisher. A intensidade de associação foi avaliada pelo cálculo dos *Odds ratio* e respectivos intervalos de confiança. A análise multivariada foi efectuada por regressão logística binária, utilizando o modelo computacional *Forward stepwise* para ajustamento dos *Odds ratio* relativamente a potenciais variáveis de confundimento e para definição do modelo final de predição. Foi assumido um nível de significância estatística de $p \leq 0,05$ e intervalos de confiança de 95,0%.

Na 4.^a e última parte do estudo, foi realizada a caracterização molecular das estirpes isoladas de *Mycobacterium tuberculosis* através da técnica *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats* (MIRU-VNTR). Aplicou-se a análise univariada e multivariada descrita anteriormente para os determinantes demográficos, sócio-comportamentais e clínicos e a frequência de agrupamentos moleculares da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo em 2003. A taxa de transmissão recente foi calculada subtraindo o número de agrupamentos moleculares ao número de isolados nos agrupamentos moleculares, o que depois foi dividido pelo número total de isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A análise de correlação entre a taxa de incidência de tuberculose por concelho de residência e a proporção de indivíduos em agrupamento molecular foi feita usando o coeficiente de correlação linear de Pearson e o seu respectivo teste de significância. Para determinar os padrões de tendência destas características recorreu-se à regressão linear simples e à regressão linear quadrática.

Resultados Principais

Na Região de Lisboa e Vale do Tejo, em 2003, foram declarados 1758 casos de tuberculose e a taxa de incidência observada foi de 50,6/100.000 habitantes (IC95% 48,3-53,1/100.000 habitantes).

Em relação à 1.^a parte do projecto de investigação, a sensibilidade dos três sistemas de vigilância em simultâneo foi de 95,0% (IC95% 92,9-96,7).

Na 2.^a parte, o estudo ecológico realizado indicou que a variação da taxa de incidência de tuberculose por concelho de residência depende da distribuição dos estabelecimentos prisionais ($\beta=25,595$; $p=0,001$) e também da infecção pelo VIH ($\beta=0,547$; $p=0,004$).

Em relação à 3.^a parte do trabalho, observaram-se 6,0% (55/923) dos casos de tuberculose multirresistente. A análise multivariada indicou que os casos de retratamento (OR 15,985; IC95% 4,376-58,390) e os prestadores de cuidados de saúde (OR 12,339; IC95% 2,400-63,429) tinham um risco acrescido de multirresistência.

Relativamente à 4.^a parte, os resultados sobre a caracterização molecular mostraram que pertencer a um agrupamento molecular está simultaneamente associado aos doentes nascidos fora de Portugal (OR 0,532; IC95% 0,334-0,847), aos doentes com tuberculose pulmonar (OR 2,756; IC95% 1,273-5,967) e aos doentes infectados pelo VIH (OR 1,779; IC95% 1,087-2,912). A taxa de agrupamento molecular encontrada foi de 54,2%.

No estudo ecológico realizado, verificou-se a existência de uma correlação entre a taxa de incidência de tuberculose por concelho de residência e o

pertencer aos maiores agrupamentos moleculares (coeficiente de correlação de Pearson R:-0,623; p=0,003).

Conclusões e Recomendações

Com este estudo foi evidente a necessidade de se desenvolver um sistema único e integrado de vigilância epidemiológica da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

Os resultados obtidos vieram igualmente demonstrar a associação entre a incidência de tuberculose e a incidência de infecção VIH nos estabelecimentos prisionais e, ainda, alertar para a importância da transmissão da multirresistência na prática clínica, justificando-se, assim, o desenvolvimento de programas de vigilância e controlo específicos para conter a transmissão da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* nas prisões e nos serviços de saúde. Foi ainda confirmada a pertinência de se iniciar a caracterização molecular sistemática da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, dirigida a grupos populacionais específicos ou a comunidades fechadas, como complemento às investigações epidemiológicas.

Palavras chave: tuberculose; técnica de captura-recaptura; sensibilidade da vigilância epidemiológica; epidemiologia molecular; *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units- Variable Number Tandem Repeats* (MIRU-VNTR); estudos ecológicos; tuberculose multirresistente; tuberculose extensivamente resistente; infecção pelo VIH; tuberculose em estabelecimentos prisionais; tuberculose em profissionais de saúde; transmissão recente da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

FREITAS, Natália Bezerra de (2009) Estudo do tráfego nucleocitoplasmático do vírus da hepatite delta, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade Biologia Celular e Molecular. IHMT. Lisboa.

O vírus da hepatite delta (HDV) é o agente etiológico responsável pelas formas mais graves e mortais de doença viral hepática para as quais não existe uma terapia eficaz.

O virião do HDV é formado por uma molécula de RNA circular e de cadeia simples associada a múltiplas cópias do antigénio delta e pelos antigénios de superfície do HBV (HBsAg). Os HBsAgs são glicoproteínas associadas ao retículo endoplasmático das células e são indispensáveis para a montagem e empacotamento de partículas delta infecciosas capazes de infecção e transmissão.

A replicação do genoma do HDV ocorre no núcleo das células por um mecanismo de círculo rolante, onde o RNA genómico do vírus serve de molde à síntese de moléculas multiméricas de RNA antígenómico, as quais possuem actividade ribozímica e se auto-clivam a intervalos precisos. Após clivagem, os antigenomas monoméricos religam-se e servem de molde à síntese de novas cadeias de RNA genómico por um mecanismo semelhante. Tanto o RNA como os HDAGs acumulam-se preferencialmente no núcleo das células. No entanto, a interacção das RNPs do HDV com os HBsAgs tem lugar exclusivamente no citoplasma. Foi demonstrado que as RNPs do HDV fazem um vai-vém contínuo entre o núcleo e o citoplasma e que a exportação nuclear das RNPs virais é um processo independente da presença de HBsAg, sendo mediado pelo RNA do HDV. O mecanismo oposto, ou seja, a importação das RNPs do HDV é um mecanismo mediado pelos antigénios delta que envolve o reconhecimento de

sinais de localização nuclear pelas proteínas celulares especializadas no transporte nuclear através do poro nuclear.

O presente trabalho teve como objectivo identificar os sinais presentes no RNA do HDV e nos HDAGs, e as proteínas celulares envolvidas no transporte núcleo-citoplasmático das RNPs do vírus. Com o objectivo de identificar os elementos de exportação nuclear presentes no RNA do HDV procedeu-se à construção e expressão de uma série de mutantes de deleção de um plasmídeo (pDL542) que codifica exclusivamente para o RNA genómico do vírus. Para a construção dos mutantes de deleção utilizou-se uma abordagem que se baseia na utilização da exonuclease III (Exo III). Os cDNAs do HDV com dimensões progressivamente menores, resultantes da digestão com a Exo III, foram clonados e utilizados para transfectar células Huh7. A identificação dos RNAs defectivos na exportação nuclear foi efectuada por comparação do padrão de distribuição intracelular de cada mutante de deleção com a localização do RNA genómico do HDV do tipo selvagem, através de experiências de hibridação *in situ*.

A presença de sinais de exportação nuclear no RNA do HDV foi também estudada por quantificação dos níveis de expressão da proteína CAT em extractos de células transfectadas com o vector repórter pDM138, no qual foram inseridos vários fragmentos de cDNA que codificam para diferentes partes do RNA genómico e antigenómico do vírus. Como resultado da transcrição do vector repórter pDM138 são produzidos mRNAs que possuem a ORF da proteína CAT inserida numa região intrónica do genoma do HIV-1. A exportação e acumulação citoplasmática destes mRNAs depende da presença de sequências funcionais na exportação e está correlacionada com o aumento dos níveis da expressão da proteína CAT. Deste modo, a presença de um sinal de exportação numa sequência de RNA pode ser facilmente investigada por quantificação da proteína repórter CAT.

O estudo da distribuição intracelular dos RNAs produzidos a partir dos mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 não permitiu identificar nenhuma sequência no RNA genómico do vírus essencial para a exportação nuclear, uma vez que todos os mutantes de deleção do RNA genómico do HDV apresentam o mesmo padrão de distribuição intracelular do RNA genómico do tipo selvagem. No entanto, registou-se uma redução significativa no número de células transfectadas em que o RNA viral foi detectado no citoplasma, quando se analisaram as formas truncadas do RNA genómico sem as sequências compreendidas entre os nucleótidos 1211 e 1487, e 476 e 512.

Os resultados dos ensaios de quantificação da expressão da proteína CAT após transfecção de células Huh7 com os vectores pDM138 que codificam para diferentes partes do RNA genómico do HDV mostraram a presença de três sequências no genoma do vírus capazes de causar um aumento na expressão da proteína CAT superior ao observado em células transfectadas com o vector pDM138 parental. Duas das sequências analisadas (nt 1191-1414 e 415-613) sobrepõem-se parcialmente com as regiões identificadas no genoma do HDV, na ausência das quais se observa uma redução significativa na percentagem de células com marcação citoplasmática. Em conjunto, estes resultados poderão indicar que o RNA genómico possui mais do que um elemento *cis* envolvido na exportação nuclear e que a eficiência do transporte do núcleo para o citoplasma está relacionada com o número de sinais de exportação presentes no genoma do vírus.

A aplicação da mesma abordagem experimental para a pesquisa de sinais de exportação no antigenoma do HDV mostrou que este RNA viral possui um elemento *cis*, situado entre os nt 1263 a 1466, funcionalmente equivalente ao

PRE do HBV. A actividade do sinal de exportação do antigenoma do HDV parece depender, da orientação da sequência identificada em relação à ORF da proteína CAT e da exportina CRM1. Demonstrou-se ainda, que o aumento da expressão da proteína repórter, induzido pela sequência compreendida entre os nt 1263 e 1466 do RNA antigenómico do HDV, resulta da exportação e acumulação citoplasmática de mRNAs repórter contendo a ORF da proteína CAT inserida no intrão.

Estes ensaios foram conduzidos na ausência de replicação viral e consequente acumulação dos HDAg, sugerindo que os antigénios delta não são necessários para o transporte do RNA antigenómico do HDV do núcleo para o citoplasma. A análise funcional do elemento de exportação no transporte do RNA antigenómico para o citoplasma foi efectuada por comparação da distribuição intracelular do antigenoma do HDV com e sem o sinal de exportação nuclear. A redução de 60% na proporção de RNA no citoplasma em relação à quantidade de RNA antigenómico nas fracções nucleares, avaliada por qRT-PCR, mostra que o sinal de exportação situado entre os nt 1263 e 1466 altera a distribuição do antigenoma do HDV. Adicionalmente, utilizando uma abordagem similar demonstrou-se que os RNAs genómicos e antigenómicos do HDV, na ausência de replicação do vírus, são exportados em quantidades semelhantes.

A abordagem utilizada para a identificação das sequências de aminoácidos do HDAg necessárias para a importação nuclear consistiu na expressão de diferentes subregiões do cDNA do HDAg clonadas na mesma grelha de leitura do gene da proteína repórter *c-myc*-PK que, na ausência de NLS funcionais, se acumula exclusivamente no citoplasma das células.

Após análise detalhada dos aminoácidos do HDAg necessários e suficientes para promover a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK confirmou-se a importância do NLS identificado na localização intracelular do HDAg nativo.

Neste trabalho, obtiveram-se evidências sólidas que a importação nuclear do HDAg é dirigida por um único NLS, constituído por uma sequência contínua de 10 aminoácidos (EGAPPAKRAR), que se situam nas posições 66 a 75 na proteína. Esta sequência corresponde ao primeiro domínio do NLS bipartido anteriormente identificado no HDAg como sendo essencial para a importação nuclear de uma proteína repórter, diferindo apenas pela presença de um resíduo de ácido glutâmico adicional. Foi ainda demonstrado, que o NLS do HDAg não é específico para células hepáticas. As experiências de cromatografia de afinidade e de espectrometria de massa realizadas com o objectivo de identificar as proteínas celulares que interagem especificamente com o NLS do HDAg não permitiram elucidar o mecanismo pelo qual o antigénio delta é importado para o núcleo. Contudo, a identificação de proteínas de ligação a elementos do citoesqueleto poderá indicar o envolvimento desta estrutura no mecanismo de importação nuclear dos HDAg e das RNPs do HDV.

MARTINS, Tiago Lopes (2009) Identification of proteases as diagnostic and targets in bovine babesiosis, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

A babesiose bovina é uma doença transmitida por carraças, que causa elevada morbidade e mortalidade, e provoca consideráveis perdas económicas devido aos esforços para controlar esta doença. As medidas de controlo da babesiose

bovina incluem a erradicação ou redução de carraças, correcto diagnóstico, assim como tratamento e vacinação apropriados. Este trabalho tem como objectivo contribuir para um melhor diagnóstico da infecção e a consequente melhoria de algumas das medidas de controlo, bem como identificar e caracterizar genes de proteases utilizados para o desenvolvimento de um método de diagnóstico e estudados como potenciais alvos para fármacos.

Para este estudo, foi realizado um trabalho de colaboração em Moçambique, onde foram colhidas amostras de sangue de bovinos naturalmente infectados, em cinco explorações situadas na província de Maputo, no sul do país. Um novo método de detecção molecular por PCR foi desenvolvido e testado utilizando DNA genómico e amostras de campo aleatórias colhidas numa das explorações. Os iniciadores de PCR foram desenhados com base no gene putativo da protease aspártica babesipsina-1 identificado nos genomas de *Babesia bigemina* e de *B. bovis*. O novo *seminested hot-start* PCR foi desenvolvido utilizando a combinação de iniciadores longos de 30 pb de comprimento e uma *hot-start* polimerase, que permitem teoricamente a utilização de temperaturas de emparelhamento acima da temperatura de *melting*, impedindo assim a formação de amplificações não específicas, o que aumenta a especificidade do método.

O novo *seminested hot-start* PCR foi avaliado utilizando 117 amostras de campo, e em paralelo com um método amplamente utilizado, o nested PCR. O *seminested hot-start* PCR neste estudo foi mais sensível que o nested PCR. Com o *seminested hot-start* PCR, 90% das amostras foram positivas para *B. bigemina*, e 82% foram positivas para *B. bovis*. Os resultados sugeriram que a babesiose bovina é comum e endémica em Moçambique, e que a doença se encontra numa situação de estabilidade endémica.

O estudo do estado da babesiose bovina em Moçambique, foi então aprofundado, através da análise de amostras de campo aleatórias de mais quatro explorações utilizando o *seminested hot-start* PCR. Todas as amostras das cinco explorações foram também analisadas utilizando o RLB, e os resultados deste método foram comparados com os dados obtidos pelo *seminested hot-start* PCR. A detecção de *Babesia* spp. diferiu significativamente entre os métodos utilizados e os locais de recolha. Com o *seminested hot-start* PCR, a detecção de *B. bigemina* nas várias explorações, variou entre 30% e 89%, com uma detecção total de 61%, e a detecção de *B. bovis* variou entre 27% e 83% com uma frequência global de 53%. Utilizando o RLB, não foi detectado *B. bigemina* e a detecção de *B. bovis* variou entre 0% e 17% com uma frequência total de 5,1%. A análise de novas sequências do gene 18S rRNA, revelou que a actual sonda do RLB para *B. bigemina* não é adequada para a detecção de todos os isolados desta espécie identificados em Moçambique. O *seminested hot-start* PCR foi portanto mais sensível que o RLB. No entanto, dez espécies diferentes dos quatro Géneros *Anaplasma*, *Babesia*, *Ehrlichia* e *Theileria* foram detectadas pelo ensaio RLB, e isso demonstra que as infecções múltiplas são comuns em Moçambique.

Os resultados deste estudo mostram que a babesiose bovina é comum na província de Maputo, e também que existem alguns locais com baixa prevalência de infecções, e portanto, os resultados sugerem que esta doença não está numa situação de estabilidade endémica na província de Maputo. São agora necessários novos estudos epidemiológicos para confirmar estes resultados.

Tem sido demonstrado que as proteases têm papéis essenciais em parasitas protozoários e estão sob estudo como promissores alvos de fármacos. Algumas proteases cisteínicas de parasitas protozoários, são já reconhecidos

alvos de fármacos, e encontram-se em validação inibidores específicos para a quimioterapia da leishmaniose, da malária e da tripanossomiase. Neste estudo, o nosso principal interesse na identificação e caracterização de proteases como alvos de fármacos foi portanto nesta classe de proteases.

Foram identificados no banco de dados do projecto em curso de sequenciação do genoma de *B. bigemina*, os genes putativos de proteases cisteínicas em pesquisas por similaridade de sequência, que posteriormente foram comparados com os genes anotados nos genomas completos das espécies de piroplasmas bovinos *B. bovis*, *Theileria annulata* e *T. parva*. Para avaliar os eventos da evolução molecular que ocorreram na família C1 de proteases cisteínicas, foram feitos alinhamentos múltiplos entre os genomas e análises das sequências obtidas destes piroplasmas de importância veterinária. Existem assim, cinco grupos distintos de genes de proteases cisteínicas da família C1 em *B. bigemina* (5 genes), quatro grupos em *B. bovis* (4 genes) e seis grupos em *Theileria* spp. (13 genes). No Género *Theileria* a evolução molecular ocorreu através da duplicação de genes e da diversificação da sequência das proteínas codificadas por estes genes. Estas importantes diferenças observadas entre os Géneros *Babesia* e *Theileria* na família das proteases cisteínicas, podem parcialmente explicar os diferentes mecanismos de infecção destas espécies, em que parasitas *Babesia* não invadem linfócitos e parasitas *Theileria* invadem primeiro os linfócitos no hospedeiro vertebrado.

A babesipapaína-1, uma das proteases cisteínicas identificadas no genoma de *B. bigemina*, foi expressa como uma proteína de fusão com a glutatona S-transferase (GST) e a respectiva fracção solúvel foi purificada por cromatografia de afinidade. A babesipapaína-1 recombinante apresentou actividade contra certos péptidos que são substratos típicos de proteases cisteínicas, e foi inibida por um inibidor geral da sua classe, mas o baixo rendimento da purificação da fracção solúvel impediu a sua caracterização adicional.

A babesipapaína-1 foi então purificada a partir da fracção insolúvel, e a proteína desnaturada foi re-enrolada e activada para produzir uma enzima activa. A análise da actividade da babesipapaína-1 revelou propriedades típicas de uma protease cisteínica da família da papaína, incluindo a hidrólise de alguns péptidos que são substratos típicos da família da papaína, um pH ácido óptimo (5.5-6.0), o requisito de um ambiente redutor para ter actividade máxima, e a inibição por inibidores de proteases cisteínicas como o E-64, a leupeptina, o ALLN e a cistatina. Os resultados sugerem que a babesipapaína-1 tem um papel no citosol, já que a babesipapaína-1 manteve elevada actividade contra substratos a pH 7,5 (83% do máximo), uma característica incomum das proteases cisteínicas de parasitas protozoários.

Assim, os resultados deste estudo demonstram que a babesiose bovina é uma infecção comum na província de Maputo em Moçambique, embora a doença não esteja numa situação de estabilidade endémica. Os resultados também sugerem que as proteases cisteínicas de *Babesia* spp. são alvos promissores para fármacos e conseqüentemente para o desenvolvimento de um tratamento eficaz para a babesiose bovina. Na sequência destes resultados foi associado um plano de trabalho futuro. Alguns pormenores e resultados deste trabalho podem ser transferidos para outros países, inclusivamente Portugal.

RODRIGUES, Olívia Roos (2009) Análise funcional da imunidade celular na infecção por *Leishmania Infantum*, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: *Leishmania infantum* é o agente responsável pela leishmaniose visceral zoonótica, uma parasitose frequentemente caracterizada por alterações específicas da imunidade celular e parasitismo progressivo. Sabe-se actualmente que as células T reguladoras (Treg) são na verdade linfócitos T que se encontram directamente envolvidos na indução de mecanismos de imunossupressão da resposta imunológica durante infecções crónicas, como por exemplo *Leishmania*. Deste modo, este estudo tem como objectivo analisar o papel das Treg durante a infecção com *L. infantum* em modelo animal susceptível. Os resultados obtidos indicam que os linfócitos T CD4+CD25+ estão presentes em murganhos BALB/c infectados com *L. infantum* e exibem características fenotípicas e funcionais de Treg. A detecção de níveis elevados de expressão do gene *foxp3* e do marcador de superfície E7 integrina (CD103) sugere a predisposição para a retenção de Treg nos locais preferenciais de infecção por *L. infantum*, como é o caso do baço e dos gânglios linfáticos, influenciando a resposta local e induzindo susceptibilidade. No entanto, apesar de neste modelo de infecção se ter observado parasitismo crónico no baço e no fígado não parece ter havido uma resposta Th polarizada o que pode estar relacionado com a expansão de Treg. Linfócitos T CD4+CD25+ que expressam Foxp3 demonstraram ter capacidade de produzir TGF-, contribuindo para a imunossupressão e controlo da imunopatologia induzida pelo parasita. Supreendentemente, linfócitos T CD4+CD25-Foxp3- produtores de IL-10 também foram identificados como fonte adicional de IL-10, representando uma sub-população de linfócitos T reguladores do tipo 1 (Tr1) cuja diferenciação foi induzida pelo parasita. Estes resultados sugerem que diferentes tipos de células T reguladoras podem ser estimuladas durante a resposta imunológica à infecção por *L. infantum*, contribuindo para a persistência do parasita e o estabelecimento da infecção crónica neste modelo experimental. Tendo demonstrado que a imunossupressão mediada por Treg é evidente no modelo susceptível de *L. infantum*, o próximo passo seria verificar se num modelo experimental de resistência, a supressão evidenciada pelas Treg seria regulada ou não pelo parasita, representando deste modo o desenvolvimento pelo parasita de uma estratégia para promover a expansão de células imunossupressivas e a inibição da resposta efectora do hospedeiro, isto é regulando os reguladores. Assim para estudar a função imunossupressora das Treg induzida por *L. infantum* e os mecanismos envolvidos na interacção hospedeiro-parasita e na regulação imunológica, a segunda parte deste estudo avalia o papel do receptor TLR-2 na função das Treg durante a infecção experimental por *L. infantum* e analisa a influência deste receptor na cinética das Treg, na resposta imunológica e na patologia. Para tal, murganhos mutantes C57BL/6 para o gene TLR-2 (TLR-2^{-/-}) e os murganhos —wild-typell C57BL/6 foram infectados com *L. infantum*. A análise comparativa foi efectuada de modo a verificar se a presença ou ausência de TLR-2 produz um efeito diferencial nos parâmetros do hospedeiro associados à dinâmica das Treg e à imunidade protectora. A ausência de sinalização TLR-2 teve um efeito visível no desenrolar da infecção. Elevadas taxas de multiplicação do parasita foram observados no baço e fígado dos murganhos TLR-2^{-/-} apesar de se ter evidenciado a presença de granulomas hepáticos aparentemente bem

estruturados e definidos. Estas formas granulatomosas são, aparentemente, ineficazes na eliminação do parasita comparativamente aos murganhos llwild-typell. A ausência de sinalização TLR-2 induziu a retenção tardia de Treg de memória, associada à elevada carga parasitária e níveis reduzidos de IFN- O TLR-2 poderá desempenhar um papel na regulação das Treg e conseqüentemente na patogénese por *L. infantum*. Nos murganhos —wild-typell, a sinalização via TLR-2 pode ser importante no controlo das populações de Treg FOXP3+ , na regulação negativa das Tregs e no desenvolvimento de imunidade protectora mais eficaz contra o parasita. A presença ou ausência de TLR-2 não influenciou a expressão de IL-10 ou de TGF- β e não está relacionado com a detecção de Treg CD103+ FOXP3+ durante a fase tardia da infecção nos murganhos TLR-2-/- . Elevados níveis de Treg nestes murganhos não foram acompanhados pela indução de citocinas imunossupressoras. A presença de níveis elevados de Treg no baço de animais infectados, na ausência de TLR-2, sugere que este receptor poderá desempenhar um papel importante na regulação dos reguladores, mediando desta forma a imunidade inata e adquirida desenvolvida pelo hospedeiro durante a infecção por *L. infantum*.

BONFIM, Idalina dos Ramos (2008) HIV 1 na República Democrática de São Tomé e Príncipe: estudos sobre a situação actual; Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: Este projecto de investigação aborda três aspectos da infecção por HIV na República Democrática de São Tomé e Príncipe (STP), nomeadamente: (i) epidemiologia dos vírus circulantes; (ii) subtipos de HIV-1 e sua filogenia; (iii) resistência a fármacos antirretrovirais.

Após a aprovação pela Comissão de Ética local, a epidemiologia dos vírus circulantes foi estudada numa amostragem efectuada nos distritos de Água Grande e Mé Zóchi, em 2007. Envolveu 1018 participantes de ambos os sexos dos 14 aos 65 anos, e consistiu num questionário anónimo com colheita de amostras aleatorizadas de sangue venoso. Estas foram testadas com “Determine™ HIV 1/2” (Abbott Diagnostics Il., USA) e, quando positivo, retestadas com “VIDAS™ HIV DUO” (BioMérieux SA). Só cinco casos foram positivos em ambos os testes, quatro de sexo masculino e um feminino.

Os subtipos de HIV-1 e a sua filogenia foram estudados no plasma de 93 amostras de conveniência de pessoas entre os 7 e os 63 anos, de ambos os sexos. Estas amostras foram colhidas em diferentes instituições de Saúde do país, de 2004 a 2007. Dois fragmentos do gene da polimerase (*pol*) – um sendo a totalidade da protease (PR, codões 1-99) e o outro, parte da transcriptase reversa (RT, codões 1-335) – foram amplificados e sequenciados com “ViroSeq HIV-1 System” e o sequenciador “ABI 3100”. As sequências cDNA resultantes da PR e da RT foram analisadas com os algoritmos de subtipagem “HIVSeq” e “REGA Subtyping Tool”. Foram desenhadas árvores filogenéticas por comparação com as sequências de referência do grupo M. As discrepâncias encontradas entre os dois algoritmos foram analisadas com o software *Simplot v3.2*. Algumas amostras foram classificadas como subtipos

puros (A, C, D, F, G, H, J) mas nenhum subtipo B foi encontrado. As amostras, na sua maioria (56%), eram recombinantes (CRF02_AG, CRF02_AG/G, CRF02_AG/H, A/CRF02_AG, K/CRF02_AG, CRF01_AE/CRF02_AG), sugerindo transmissão local. Os subtipos A, G e os seus recombinantes representaram mais do que $\frac{3}{4}$ do total.

Em pessoas infectadas, nas mesmas sequências de cDNA quer de doentes nunca tratados quer de doentes sob tratamento, o padrão de resistências genóticas aos ARVs foi avaliado com o “Stanford HIV Drug Resistance Algorithm” (*beta test*). As mutações de resistência encontradas foram: uma de tipo PIs (primária – F53L), oito de tipo NRTIs (M41L, T69N/S, M184I/V, T215Y/S e K219Q) e seis de tipo NNRTIs (A98G, K103N/S, V179E, Y181C, G190A). Foram também encontrados vários polimorfismos nos sítios da PR e da RT.

Embora a prevalência do HIV-1 fosse ainda relativamente baixa (0,5%), a grande diversidade genética dos vírus de subtipos não-B em circulação em STP, pode comprometer quer a fiabilidade dos testes serológicos quer a eficácia de hipotéticas futuras vacinas para os países da África Central e da costa Ocidental.

CALADO, Maria Manuela (2008) Estudos ecológicos e moleculares dos hospedeiros intermediários *Planorbarius metidjensis* e *Bulinus truncatus* de Portugal, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: *Planorbarius metidjensis* e *Bulinus truncatus*, identificados como hospedeiros intermediários de *Schistosoma haematobium* e *S. bovis*, foram o objecto do nosso estudo.

Este trabalho está dividido em seis capítulos que de certo modo, se encontram relacionados entre si. No **Capítulo 1**, faz-se uma abordagem geral sobre estas duas espécies de moluscos com importância em medicina, com breves considerações sobre a sua classificação, características morfológicas e distribuição no mundo e em Portugal. Do mesmo modo, a revisão de literatura realça aspectos importantes relacionados com interacção do molusco, hospedeiro intermediário e o tremátode parasita e a aplicação das novas técnicas moleculares nesta área.

No intuito de rever a distribuição geográfica destas duas espécies de moluscos em Portugal continental, foi realizado um levantamento malacológico em vários distritos, cujos resultados são apresentados no **Capítulo 2**. Os distritos em estudo foram Beja, Coimbra, Évora, Faro, Guarda, Lisboa, Portalegre, Setúbal e Viseu, tendo sido colhidos 3219 exemplares de *P. metidjensis*, enquanto para *B. truncatus* não foi encontrado nenhum exemplar. Por isso, a segunda parte do trabalho decorreu com exemplares de *B. truncatus*, mantidos há várias gerações no Laboratório de Malacologia da Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas, e tendo origem em exemplares colhidos pela Prof^a Doutora Maria Amélia Grácio, Directora da Unidade. Ainda neste capítulo e com base nos dados recolhidos, foi feita a caracterização dos habitats segundo o seu tipo físico, natureza e aspectos bioecológicos.

No **Capítulo 3**, destaca-se a variabilidade encontrada nas características morfométricas da concha de *P. metidjensis* nos diferentes distritos, o que permitiu evidenciar dois grupos distintos. O primeiro engloba as regiões do Alentejo, Algarve e Estremadura e o segundo, as regiões das Beiras e Sado. O tipo físico dos habitats e as características das conchas dos moluscos colhidos parecem ser os factores explicativos para esta similaridade. Neste capítulo também é feita uma abordagem sobre a dinâmica populacional de quatro habitats seleccionados com base nas características físicas de cada um deles (dois do distrito de Évora e dois do distrito de Faro).

No **Capítulo 4**, estudam-se os moluscos em relação a uma eventual infecção natural por tremátodes, bem como, a sua susceptibilidade à infecção por *Schistosoma haematobium* (estirpe de Angola) e *S. mansoni* (estirpe do Brasil). No total de 3219 *P. metidjensis* examinados, 1456 (45,2%) eliminaram xifideocercárias. Quanto à susceptibilidade de *P. metidjensis* a *S. haematobium*, os resultados vieram, mais uma vez, confirmar a não susceptibilidade desta espécie de moluscos à estirpe angolana de *S. haematobium*. Em relação a *S. mansoni*, alguns exemplares de *P. metidjensis* desenvolveram infecção até à fase de esporocisto, apesar de não chegarem a eliminar cercarias. Estes resultados não se verificaram nos moluscos *B. truncatus*.

No **Capítulo 5**, é feito pela primeira vez, um estudo molecular de *P. metidjensis*. Neste estudo foram usados exemplares de *P. metidjensis* de diferentes habitats e agrupados em cinco distritos, para analisar a sua posição sistemática e relação filogenética com outras espécies homólogas cujas sequências se encontram no GenBak. Nesta análise foram usadas as sequências parciais dos genes mitocondriais COI e 16S, tendo-se identificado um total de nove haplotipos para o gene COI e quatro para o gene 16S. Estes resultados mostraram que o maior número de haplotipos foi encontrado no distrito de Coimbra, para ambos os genes, significando que os habitats deste distrito foram mais polimórficos que os restantes.

Com base nos resultados obtidos para os genes COI e 16S, *P. metidjensis* de Portugal apresentaram uma elevada homologia (81%) com outras espécies de *Planorbium* spp, bem como, com espécies de *Biomphalaria* spp das regiões Neotropical e Africana, hospedeiros intermediários de *S. mansoni* e de outros tremátodes. Para avaliar qual o grau de diversidade genética de *P. metidjensis* foram usados marcadores de RAPD nos moluscos colhidos em 19 habitats (de nove distritos). Os resultados evidenciaram não só uma elevada variabilidade genética, determinada pelo Índice de Shannon ($H_o=0,4981$), como também, uma alta diferenciação genética ($G_{st}=0,238$) inter e intrapopulacional (de acordo com os pressupostos de Wright, 1978).

À semelhança do capítulo anterior, no **Capítulo 6**, faz-se pela primeira vez uma caracterização molecular de *B. truncatus* de Portugal. Como já foi referido anteriormente, não foi possível colher exemplares desta espécie durante o trabalho de campo, por isso este estudo realizou-se com as populações mantidas no laboratório. Os resultados do estudo, em que se aplicou a técnica de RAPD, evidenciaram uma elevada diferenciação genética entre as populações ($G_{st}=0,28$), assim como, uma elevada variabilidade genética intrapopulacional determinada pelo Índice Shannon ($0,5294 \pm 0,1787$) a qual parece estar relacionada com o baixo número de migrantes. Foram também utilizados como marcadores moleculares o gene COI do ADN mitocondrial e ITS (Região Interna Transcrita) do ADN ribossomal para análise da posição sistemática e relação filogenética com outras espécies homólogas (hospedeiras intermediárias de *Schistosoma* spp) cujas sequências se encontram no

GenBank, as quais evidenciaram homologia muito elevada com as espécies *B. truncatus* (Sudão) e *B. tropicus*. Além disso, foi identificado um total de sete haplotipos para a região ITS e nove para o gene COI, sendo a população de moluscos de Estói a que apresentou três haplotipos, enquanto as restantes populações apresentaram quatro haplotipos distintos. Os resultados globais para *Fst* foram muito baixos, sugerindo tratar-se de uma mesma população.

CORTES, Sofia Júdice (2008) Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

RESUMO

O presente estudo teve como principal objectivo avaliar a diversidade genética de uma população parasitária de *Leishmania* em isolados portugueses de hospedeiros humanos, caninos, vulpinos e do vector, aplicando dois marcadores moleculares: kDNA e microssatélites.

No Capítulo 1 fez-se uma revisão bibliográfica sobre as leishmanioses incluindo a epidemiologia da infecção nos países da bacia mediterrânica nomeadamente Portugal. Deu-se especial relevo à epidemiologia molecular que nos últimos anos tem vindo a ser desenvolvida.

No Capítulo 2 efectuou-se um inquérito de leishmaniose canina que abrangeu 374 cães provenientes da Região Metropolitana de Lisboa. Foi encontrada uma prevalência total de 19,2%, com a prevalência de 18,4% nos cães com dono e 21,6% nos cães sem dono ou vadios. Os resultados obtidos evidenciaram a importância dos cães vadios na transmissão do parasita e disseminação da doença. A partir dos 72 cães infectados, foram isolados 49 estirpes de *Leishmania*, tendo estas sido tipadas como *L. infantum* zimodeme MON-1.

Estas estirpes, em conjunto com outras amostras isoladas a partir de humanos, vector e outros canídeos, foram utilizadas para avaliar a diversidade genética.

No Capítulo 3 foram desenvolvidas sequências iniciadoras cinetoplastideais, MC1 e MC2, tendo-se estas revelado específicas e sensíveis para a identificação do complexo *L. donovani* isolados em cultura ou directamente a partir de amostras clínicas. Aplicou-se a metodologia de kDNA-PCR-RFLP na análise de 161 amostras de DNA, das quais 134 eram provenientes de isolados portugueses de *L. infantum*. Foram identificados 16 genótipos na totalidade das amostras, tendo 13 sido identificados nas amostras portuguesas.

Observou-se a predominância do genótipo A, observado exclusivamente na população parasitária portuguesa. Em termos geográficos esta metodologia mostrou estar de acordo com a tipagem isoenzimática, e outros marcadores moleculares, individualizando as amostras provenientes de África num único genótipo. No entanto não se observou individualização ao nível das regiões de Portugal estudadas, sugerindo a existência de fluxo genético entre as diferentes áreas geográficas.

No Capítulo 4 aplicou-se a análise de 13 *loci* de microssatélites, polimórficos para *L. infantum*, em 154 amostras, das quais 128 eram provenientes de diferentes regiões geográficas de Portugal e de diferentes hospedeiros e vector. Obteve-se um maior grau de polimorfismo com estes marcadores do que com o kDNA, identificando-se 85 genótipos.

Observou-se uma maior diversidade molecular nas amostras provenientes do Algarve e Alto Douro e, relativamente ao hospedeiro, estes alvos moleculares mostraram ser muito mais polimórficos no hospedeiro humano que o canino, indo ao encontro dos resultados de tipagem isoenzimática que se conhecem até à actualidade. Foi individualizado um agrupamento de amostras não MON-1 e dentro deste, um sub-agrupamento das amostras de África Oriental (Etiópia e Sudão), como anteriormente sugerido por outros autores.

No Capítulo 5 discutiram-se os resultados obtidos permitindo verificar que a variabilidade dos parasitas *Leishmania* no nosso país é maior do que tem sido considerada até ao presente. Possibilitaram também o conhecimento de que há genótipos predominantes em Portugal e que a variabilidade genética no hospedeiro humano e no vector é superior à do reservatório doméstico e silvático.

FERNANDES, Natérica Pedro (2008) Contribuição para o estudo de resistência aos antimaláricos e análise de marcadores moleculares de *Plasmodium falciparum* e do hospedeiro humano, em Maputo, Moçambique, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: A malária é de longe a doença parasitária mais importante em Moçambique, constituindo um grave problema de saúde pública no País. Apesar de se considerar que um diagnóstico atempado e um tratamento correcto são os elementos básicos para um programa de controlo da malária bem sucedido, nas últimas décadas, o controlo e tratamento têm sido bastante dificultados pelo aparecimento e disseminação da resistência parasitária aos antimaláricos mais utilizados. Os mecanismos que conferem ao parasita a capacidade de resistir à maioria dos antimaláricos disponíveis não se encontram completamente elucidados.

Deste modo, este trabalho teve como objectivo principal avaliar o envolvimento dos genes *pf dhfr*, *pf dhps*, *pf crt*, *pf mdr1* e *pf ATPase6* na resistência aos antimaláricos em Moçambique, recorrendo a populações naturais de parasitas em isolados colhidos de doentes com malária em Maputo, Moçambique. Neste contexto, foi efectuada a caracterização clínica dos pacientes com diferentes formas clínicas de malária e os perfis genotípicos relacionados com a resistência em *P. falciparum* para quatro antimaláricos: cloroquina, sulfadoxina/pirimetamina, amodiaquina e artemisinina, através da técnica de PCR-RFLP, para os polimorfismos *pf crt* K76T e N75E, *pf dhfr* N51I, C59R, S108N e I164L, *pf dhps* A437G e K540E, *pf mdr1* N86Y e N1246Y e *pf ATPase6*, G1916 A, G110A, A2694T e G2306A.

Os dados genotípicos foram subseqüentemente analisados estatisticamente, no intuito de detectar associações significativas entre a presença de um determinado marcador antes e depois do tratamento com os diferentes antimaláricos utilizados. Foram também avaliados os polimorfismos em dois marcadores moleculares (ICAM-1 e CD36) do hospedeiro relacionados com susceptibilidade/resistência à malária, em isolados de pacientes com e sem malária. Os polimorfismos da variante CYP-450 (*CYP2C8*), relacionada com o metabolismo dos fármacos antimaláricos em pacientes com malária, foram também aqui analisados.

Os resultados demonstraram a gravidade do problema de resistência a antimaláricos, evidenciado pelas elevadas prevalências dos alelos mutantes antes e depois dos tratamentos efectuados. Foi aqui observada uma elevação significativa de amostras contendo o alelo mutado *pf dhps* 437G após do tratamento com Fansidar® e com Fansidar®+Amodiaquina. Verificou-se existir uma correlação positiva entre o quántuplo mutante e o número de isolados, depois do tratamento com Fansidar®. Estes resultados indicam reservas na utilização do Fansidar® como uma componente da primeira linha de tratamento antimalárico no País e apontam o polimorfismo *pf dhps* 437G como um possível marcador para a monitorização da resistência a este fármaco.

Apesar de não significativos, os resultados da análise do ICAM-1 mostraram a existência de uma possível associação entre a presença da mutação ICAM-1kilifi e a infecção malárica nas suas formas grave e não grave, enquanto para o CD36 foi notória a ausência da mutação T1264G no grupo controle (sem malária). Os resultados da análise dos polimorfismos no gene *CYP2C8* demonstraram alguma inconclusividade, tendo no entanto permitido a obtenção de conhecimentos para estudos que possam ser realizados no futuro.

FERREIRA, Isabel Dinis (2008) Estudos de susceptibilidade à artemisinina e derivados em *Plasmodium falciparum*, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: A resistência do *Plasmodium falciparum* à maioria dos antimaláricos em uso é um dos maiores obstáculos ao controlo eficaz da doença. Excepcionalmente, a resistência *in vivo* à artemisinina e seus derivados não foi ainda detectada. Contudo, é amplamente aceite que existe um risco real de aparecimento de resistência a esta classe de antimaláricos. Deste modo, este trabalho teve como finalidade investigar diversos aspectos do fenótipo e genótipo do perfil de fármaco-susceptibilidade à artemisinina e seus derivados no parasita *Plasmodium falciparum*, recorrendo a populações naturais de parasitas e a um modelo de laboratório. Neste contexto, foi efectuado um estudo multicêntrico, onde se avaliou a susceptibilidade *in vitro* a derivados da artemisinina em populações naturais de *P. falciparum* provenientes do Ruanda, da República Democrática de São Tomé e Príncipe (RDSTP) e do Brasil e se investigou o perfil genotípico de determinados genes candidatos nas mesmas amostras. No laboratório, utilizou-se o clone *P. falciparum* Dd2 para seleccionar clones resistentes à artemisinina *in vitro*. Em todos os parasitas efectuaram-se estudos de associação entre os níveis de susceptibilidade à artemisinina e derivados e mutações ou alteração no número de cópias de genes previamente apontados como potenciais moduladores da resposta a esta classe de antimaláricos tais como os genes *pf crt*, *pf mdr1*, *pf ATPase6*, *pf tctp* e *pf ubp-1*, bem como genes que codificam proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa ao stress oxidativo, propostos no âmbito deste trabalho: *pf sod1*, *pf gst*, *pf ygs*, *pf gr*, *pf gpx*, *pf trx1*, *pf trx2* e *pf prx*.

Os resultados obtidos para as populações naturais de *P. falciparum* Africanas e do Brasil em termos de susceptibilidade *in vitro* às artemisininas, parecem estar em conformidade com o descrito em outras áreas endémicas onde se observa que apesar de existir uma variação significativa na sua susceptibilidade, não existe evidência de resistência. No entanto, verificou-se existir uma correlação positiva entre as respostas aos derivados da artemisinina e a amodiaquina,

antimalárico de diferente classe, o que indicia a existência de um fenótipo de tolerância cruzada entre compostos de classes diferentes.

Apesar de não ter sido detectada uma associação estatisticamente significativa entre a resposta dos isolados às artemisininas e os genes analisados, esta componente do trabalho permitiu que se avaliasse a estrutura populacional do parasita *P. falciparum* em termos de fenótipo bem como do perfil de genes apontados como moduladores das respostas a estes fármacos antes da aplicação em larga escala dos mesmos. Estes dados constituem assim uma ferramenta singular de fármaco-vigilância, dado poderem ser utilizados em futuros ensaios como termo de comparação que permite avaliar a evolução das populações parasitárias em termos fenotípicos e genotípicos.

A selecção *in vitro* de clones resistentes à artemisinina partindo de progenitores sensíveis, *P. falciparum* Dd2, permitiu obter uma população de parasitas com susceptibilidade 100 vezes reduzida em relação ao seu progenitor, a qual se designou Dd2-ARTmut. No entanto, a resistência obtida demonstrou ser instável, tendo desaparecido na ausência de pressão de fármaco, dando origem a uma estirpe que se passou a denominar Dd2-ARTmutREV. A comparação entre os clones Dd2-ARTmut e o progenitor sensível Dd2 em relação a potenciais genes moduladores da susceptibilidade às artemisininas, revelou ter ocorrido amplificação do gene *pfmdr1*, bem como um aumento da sua expressão. Curiosamente, a amplificação do gene *pfmdr1* foi mantida após a reversão da resistência, na estirpe Dd2-ARTmutREV, levantando novas questões sobre o efeito causal desta amplificação na modulação das respostas à artemisinina e seus derivados.

LOPES, Luís da Silva (2008) Efeito da refeição sanguínea anticorpos e infecções mistas no desenvolvimento esporogónico de *Plasmodium* spp, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa

Resumo : A transmissão de *Plasmodium* ao mosquito e o seu desenvolvimento esporogónico são alvos importantes para o desenvolvimento de métodos de controlo de transmissão. Nesta fase do ciclo de vida, o parasita enfrenta condições muito adversas derivadas do mosquito e da própria refeição sanguínea. É nesta altura que se observam as maiores reduções do número de parasitas e como tal a manipulação artificial destas condições poderia levar a uma redução significativa da transmissão.

Vários factores da refeição sanguínea tais como anticorpos, fármacos, refeições múltiplas ou presença de várias estirpes ou espécies de parasitas, podem diminuir ou pelo contrário potenciar a transmissão. Além disso, o ambiente no intestino médio é adverso devido à digestão da refeição sanguínea e a uma resposta imunológica eficaz produzida pelo mosquito contra o parasita. Várias linhas experimentais foram seguidas no sentido de contribuir para o entendimento da forma como alguns destes factores afectam o desenvolvimento do parasita.

Estudou-se o efeito de uma segunda alimentação sanguínea e de soro de *Rattus rattus* e de *Mus musculus* (BALB/c) contendo anticorpos anti-esporozoíto de *Plasmodium yoelii yoelii*, na taxa e na intensidade de infecção em mosquitos *Anopheles stephensi*. Foram ainda avaliadas alterações na expressão de genes do parasita e do mosquito, pelo método de DDRT-PCR e

os resultados confirmados por qRT-PCR. A taxa e a intensidade de infecção foram reduzidas de forma significativa quando os mosquitos foram alimentados com soro imune. Foram também identificados, por DDRT-PCR, dois genes de *P. yoelii yoelii* e oito de *A. stephensi*, cuja expressão foi alterada pela segunda alimentação sanguínea e/ou pelo tratamento com soro imune. Quando a expressão foi analisada por qRT-PCR observaram-se diferenças estatisticamente significativas, na expressão de alguns genes nos diferentes grupos de tratamento.

No decurso deste trabalho foi testado um método para a cultura de oocinetos de *Plasmodium falciparum*. Embora se tenham obtido oocinetos, o seu número era insuficiente para utilização em experiências subsequentes e o método não foi implementado.

Para determinar o impacto de uma infecção mista no desenvolvimento parasitário no mosquito foram realizadas infecções experimentais com *P. falciparum* e/ou *Plasmodium vivax*.

Mosquitos *Anopheles albimanus*, foram infectados por alimentação artificial de membrana, com sangue de doentes infectados com apenas uma das espécies. A realização de infecções experimentais e recolha de material biológico foi feita em Buenaventura e Cali, na Colômbia.

Analisou-se a dinâmica de infecção nos mosquitos, assim como a resposta de alguns genes do seu sistema imunológico a infecções simples e mistas, com ambas as espécies. Os resultados obtidos para a dinâmica de infecções não mostrou nenhum efeito evidente de uma espécie sobre a outra, no entanto tratou-se de um estudo preliminar. Verificou-se que alguns dos genes estudados parecem responder à infecção e foram também observados padrões de expressão diferentes de acordo com o tipo de infecção. Observou-se o aumento de expressão de alguns genes, sendo mais evidente no corpo gordo, especialmente na altura de libertação de esporozoítos do oocisto.

No intestino médio, a *cecropina 3* foi o gene cuja expressão foi mais alterada, verificando-se um aumento de expressão às 24 horas, altura em que se dá a invasão do epitélio pelos oocinetos.

Alguns dos factores analisados mostraram ter um efeito no desenvolvimento esporogónico

de *Plasmodium*, podendo esse efeito ser directo no parasita ou indirecto afectando a resposta do mosquito à infecção. Verificaram-se alterações na expressão génica quer em *Plasmodium* quer em *Anopheles* como resposta às diferentes variantes experimentais mas estudos mais específicos são necessários para aferir os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos observados e o seu impacto em medidas de controlo da malária.

MAIA, Carla Soares (2008) Interacção parasita hospedeiro e susceptibilidade de *leishmania infantum* a fármacos, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: As leishmanioses são doenças causadas por um protozoário intracelular pertencente à ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, do género *Leishmania*. Os parasitas são transmitidos aos hospedeiros vertebrados por dípteros pertencentes à sub-família Phlebotominae. Devido à inexistência de vacinas a quimioterapia continua a representar o único

mecanismo de prevenção e controlo. Os fármacos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose visceral continuam a ser os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B (AMB). A AMB lipossómica está a ser cada vez mais utilizada como 1ª linha. O conhecimento do(s) mecanismo(s) utilizados pelos parasitas, responsáveis pela resistência, é fundamental de modo a permitir o desenvolvimento de novos fármacos anti-*Leishmania* que possam substituir e/ou complementar os fármacos existentes, de uma forma eficaz assim como contribuir para o desenvolvimento de metodologias para avaliar e monitorizar a resistência.

Espera-se do modelo animal a reprodução da infecção na Natureza. Os modelos canino e murino têm ajudado na compreensão dos mecanismos responsáveis pela patogénese e pela resposta imunitária à infecção por *Leishmania*.

Sendo o cão o principal hospedeiro da infecção por *L. infantum* e o principal reservatório doméstico da leishmaniose visceral humana, procedeu-se à caracterização da evolução da infecção experimental em cães de raça Beagle através da análise clínica, hematológica, histopatológica, parasitária, assim como através da resposta imunitária desenvolvida. As alterações hematológicas observadas foram as associadas à leishmaniose visceral: anemia, leucopenia, trombocitopenia com aumento das proteínas totais e da fracção gama-globulina, e diminuição da albumina. Histologicamente observou-se nos órgãos viscerais uma reacção inflamatória crónica, acompanhada por vezes da formação de granulomas ricos em macrófagos. Apesar de todos os animais terem ficado infectados (confirmado pela presença do parasita nos vários tecidos e órgãos recolhidos na necrópsia), os únicos sinais clínicos observados transitoriamente foram adenopatia e alopecia. As técnicas moleculares foram significativamente mais eficazes na detecção do parasita do que os métodos parasitológicos convencionais. As amostras não invasivas (sangue periférico e conjuntiva) mostraram ser significativamente menos eficazes na detecção de leishmanias. No nosso modelo experimental não se observou a supressão da resposta celular ao antígeno parasitário e confirmou-se que, apesar de não protectora, a resposta humoral específica é pronunciada e precoce. A bipolarização da resposta imunitária Th1 ou Th2, amplamente descrita nas infecções experimentais por *L. major* no modelo murino, não foram observadas neste estudo. O facto dos animais não evidenciarem doença apesar do elevado parasitismo nos órgãos viscerais poderá estar relacionado com a expressão simultânea de citocinas de ambos os tipos Th1 e Treg, no baço, fígado, gânglio, medula óssea e sangue periférico.

Neste estudo também se caracterizou o efeito da saliva do vector *Phlebotomus perniciosus* na infecção experimental de murganhos BALB/c com estirpes de *L. infantum* selvagem e tratada com AMB, inoculadas por via intradérmica. A visceralização da infecção ocorreu após a utilização da via de administração do inóculo que mais se assemelha ao que ocorre na Natureza. Apesar da disseminação dos parasitas nos animais co-inoculados com extracto de uma glândula salivar ter sido anterior à do grupo inoculado apenas com parasitas, não se detectaram diferenças significativas na carga parasitária, entre os três grupos, ao longo do período de observação pelo que, embora a saliva do vector esteja descrita como responsável pela exacerbação da infecção, tal não foi observado no nosso estudo. O aumento de expressão de citocinas esteve relacionado com o aumento do parasitismo mas, tal como no modelo canino, não se observou bipolarização da resposta imunitária. Os animais dos três grupos infectados parecem ter desenvolvido nos diferentes órgãos uma resposta mista dos tipos Th1 e Th2/Treg. Contudo, verificou-se a

predominância da expressão Th1 (TNF- α), no fim do período de observação, o que pode estar relacionado com a resolução da infecção.

Por outro lado, a presença de parasitas na pele dos animais inoculados com a estirpe *L. infantum* tratada com AMB permite colocar a hipótese da existência de parasitas resistentes na Natureza e destes poderem ser transmitidos.

Após se ter verificado que a estirpe de *L. infantum* tratada com AMB tinha a capacidade de infectar e visceralizar no modelo murino, analisou-se o seu comportamento em dois dos principais vectores de *L. infantum*, *Lutzomyia longipalpis* e *P. perniciosus*. Os parasitas tratados com AMB apresentaram uma menor capacidade de permanecerem no interior do vector assim como um desenvolvimento mais lento apontando para uma menor capacidade de transmissão das estirpes resistentes a este fármaco, pelo que o tratamento com AMB poderá ser favorável à prevenção e controlo através da interrupção do ciclo de vida do parasita.

De modo a determinar *in vitro* a susceptibilidade de *Leishmania* aos diferentes fármacos utilizados na terapêutica da leishmaniose humana e canina (Glucantime®, Fungizone®, miltefosine e alopurinol) comparou-se o sistema de promastigotas axénicos com o sistema amastigota-macrófago. Verificou-se que, para as estirpes estudadas, os resultados de ambos os sistemas não apresentavam diferenças significativas sendo a utilização do primeiro mais vantajosa ao ser menos moroso e de mais fácil execução. Seleccionaram-se estirpes quimio-resistentes *in vitro*, por exposição prolongada a doses crescentes de AMB, tendo-se verificado que os parasitas tratados, apresentaram uma menor susceptibilidade do que os não tratados à acção dos fármacos estudados, com excepção do alopurinol. A diminuição da susceptibilidade das estirpes aos fármacos utilizados poderá facilitar a dispersão de parasitas multiresistentes. Sendo a apoptose um dos mecanismos utilizados pelos parasitas para evitar a indução de uma resposta imune por acção de compostos anti-*Leishmania*, determinou-se o número de amastigotas apoptóticos assim como a produção de TNF- α e IL-10 pelos macrófagos tratados. Concluiu-se que os compostos conseguiram suprimir a produção de IL-10, inibidora da activação dos macrófagos, contudo nem a produção da citocina pro-inflamatória TNF- α nem a apoptose pareceram ser os principais mecanismos responsáveis à sobrevivência dos parasitas ao contacto com os fármacos.

MARTINS, Marta Lopes (2008) The role played by efflux systems on the resistance to antibiotics, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

RESUMO

A resistência a várias classes de antibióticos, *i.e.*, multi-resistência (MDR), constitui um dos maiores problemas a nível terapêutico, no tratamento de diversas infecções. A importância que este mecanismo de resistência adquiriu no contexto hospitalar, reflecte-se no elevado número de casos relativos a multi-resistência em isolados clínicos. Os mecanismos de resistência mais comuns em bactérias são: i) a inactivação do antibiótico pelas enzimas bacterianas; ii) mutações em genes estruturais ou reguladores da proteína alvo; iii) alterações na membrana externa, que podem provocar um decréscimo da permeabilidade

aos diversos compostos, sendo este caso mais relevante em bactérias Gram-negativas, dada a sua estrutura membranar; e iv) extrusão do antibiótico da célula por activação de sistemas de efluxo. Estes últimos sistemas encontram-se normalmente associados a uma sobre-expressão de transportadores proteicos, designados bombas de efluxo, que reconhecem e expõem eficientemente uma vasta gama de compostos estruturalmente distintos. Estes transportadores, que se encontram envolvidos na extrusão de substratos tóxicos, encontram-se quer em bactérias Gram positivas, quer em bactérias Gram negativas, bem como em células eucariotas. Estes sistemas podem ser específicos para um substrato ou podem transportar uma série de compostos estruturalmente distintos, incluindo antibióticos de classes diferentes. Os sistemas de efluxo descritos até à presente data podem ser classificados em cinco famílias distintas, nomeadamente: (1) “Major Facilitator Superfamily” (MFS); (2) “Small Multi-drug Resistance (SMR) family”; (3) “Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE) family” (21); (4) “Resistance-Nodulation-Division (RND) superfamily”; and (5) “Adenosine Triphosphate (ATP)-Binding Cassette (ABC) superfamily”. Estes sistemas utilizam a força motriz de prótons, como fonte de energia, com a excepção da família ABC, que utiliza a hidrólise do ATP para fazer a extrusão dos substratos. Um dos mais recentes desafios nesta área tem sido o desenvolvimento de novos compostos que inibam estes sistemas de efluxo e conseqüentemente possam potenciar a actividade de antibióticos que sejam coadministrados na terapêutica, podendo desta forma dar uma nova utilidade clínica aos antibióticos já existentes. Infelizmente e apesar de vários inibidores de bombas de efluxo (aqui designados como EPIs – “efflux pump inhibitors”) terem sido sintetizados, até à presente data, nenhum destes inibidores resultou num composto com utilidade clínica, que pudesse ser aplicado no tratamento de infecções provocadas por bactérias multiresistentes. No entanto, a procura continua e de entre os vários tipos de EPIs caracterizados, podemos encontrar uma grande e variada gama de compostos, como: análogos peptídicos; as fenotiazinas; um grupo de produtos naturais produzidos por *Streptomyces* spp, (“benastatins”); compostos derivados ou homólogos da tetraciclina; compostos isolados de extractos de plantas; a quinolona e alguns dos seus derivados; arilpiperidinas and arilpiperazinas; EPIs produzidos por microrganismos e um grupo distinto de compostos, os desacopladores de energia. Se estes EPIs puderem ser utilizados como “helper compounds”, em combinação com os antibióticos aos quais o microrganismo é resistente, então o tratamento destas infecções poderá ser bem sucedido.

Esta nova abordagem pode permitir a re-utilização de vários antibióticos que são substratos de bombas de efluxo, bem como permitir o controlo do aparecimento e disseminação de estirpes que apresentam uma multi-resistência mediada por sistemas de efluxo. No entanto, ainda pouco se sabe acerca dos mecanismos e função destes sistemas.

Desta forma, torna-se necessário desenvolver novos métodos que permitam caracterizar esta resistência, mediada pelos sistemas de efluxo. Nos últimos anos, uma série de métodos têm sido desenvolvidos com este intuito e podem contribuir para a rápida identificação de estirpes multi-resistentes. De entre a metodologia usualmente utilizada, o método que tem recebido particular destaque, tem sido o que se baseia no efluxo do brometo de etídeo. O brometo de etídeo é um conhecido substrato de bombas de efluxo e dadas as suas propriedades fluorescentes, permite a monitorização em tempo real dos sistemas de efluxo que se encontram activados numa dada estirpe bacteriana. A criação e o desenvolvimento deste e de outros métodos, torna-se portanto uma importante ferramenta para estudar e caracterizar grandes colecções de

isolados clínicos que apresentam um fenótipo multi-resistente. A combinação das novas abordagens descritas anteriormente, *i.e.*, a caracterização de isolados que apresentam um fenótipo multirresistente mediado por sistemas de efluxo, aliada à busca de novos e efectivos EPIs, pode contribuir para o controlo e tratamento eficaz de infecções multi-resistentes. O futuro o dirá...

MARTINS, Marta Lopes (2008) The antimycobacterial activity of thioridazine derivatives against drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: In vitro, ex vivo and in vivo studies, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

RESUMO

O objectivo principal desta tese foi o de avaliar a acção da tioridazina (TZ), bem como de compostos derivados desta, obtidos por manipulação química, como agentes com actividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, em particular contra *M. tuberculosis* multi-resistente (MDR-TB). Desta forma foram obtidos vinte e dois derivados e efectuados testes de toxicidade e mutagenicidade pelo método de exclusão com azul de trypan (realizado em linfócitos humanos) e o teste de Ames, respectivamente. Todos os derivados não tóxicos e não mutagénicos foram testados *in vitro* contra estirpes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que foi o microrganismo modelo utilizado durante todo o trabalho, e estirpes de MDR-TB. Visto que a tuberculose é uma infecção do macrófago alveolar, estes estudos foram subsequentemente aplicados a macrófagos infectados. Desta forma, é importante analisar a actividade que estes compostos apresentam dentro do macrófago, local onde normalmente a micobactéria se encontra. Iniciaram-se estudos animais com a TZ, de forma a verificar a eficácia deste composto em curar murganhos Balb/C infectados com *M. tuberculosis* H37Rv ATCC27294. Desta forma foi possível otimizar parâmetros, tais como, a via de infecção, a concentração de composto a administrar, entre outros. Os resultados obtidos demonstraram que dos vinte e dois derivados nenhum apresentava toxicidade ou efeitos mutagénicos, nas condições testadas. Desta forma, os vinte e dois derivados foram seleccionados para estudos *in vitro* contra estirpes de *S. aureus* e de *M. tuberculosis*. Dos estudos *in vitro* foi possível verificar que seis derivados apresentaram uma maior actividade do que a TZ e desta forma foram seleccionados para os estudos *ex vivo*. Quando testados em macrófagos infectados três derivados demonstraram um efeito marcado na activação das células fagocitárias (“enhancement of the killing activity”), sendo um dos derivados ainda mais activo do que a TZ. Dos estudos em animais, foi possível seleccionar as condições a serem implementadas em estudos futuros com os derivados mais activos. De todos os resultados obtidos durante esta tese foi possível desenvolver um modelo baseado na interacção do macrófago com a bactéria e a subsequente acção destes compostos. O modelo desenvolvido (“macrophage model”) pode assim contribuir para clarificar o que ocorre a nível intracelular aquando da adição dos compostos ao meio de cultura.

Devido à inovação das abordagens desenvolvidas durante esta tese, outras potenciais fontes de compostos tuberculostáticos foram exploradas, tais como, plantas e compostos SILA. Os estudos desenvolvidos demonstraram que extractos da planta *Carpobrotus edulis* podem apresentar actividade

antibacteriana contra bactérias intracelulares, tais como, MDR-TB e MRSA. Adicionalmente, foi demonstrado que este extracto é um imuno-modulador do sistema imunitário, o que reflecte a sua potencial utilização em disfunções imunes verificadas a nível celular. Outra das potenciais aplicações é a sua utilização em linhas celulares murinas de linfoma multi-resistentes (que apresentam o gene *mdr1*), tornando-as completamente susceptíveis a compostos citotóxicos, aos quais estas células eram inicialmente resistentes. Os resultados desta componente da minha tese contribuíram para o “desenho” de novas experiências que se encontram de momento a ser desenvolvidas por outra aluna de doutoramento, na Unidade de Micobacterias e na Universidade Médica de Szeged, Hungria.

Em conclusão, o trabalho desenvolvido durante esta tese veio abrir caminho para a aplicação dos vários compostos analisados em ensaios clínicos, dado que estes demonstraram ter actividade intracelular contra estirpes de XDR-TB/MDR-TB a concentrações não tóxicas e que podem ser facilmente atingidas num indivíduo infectado.

NOVO, Maria Teresa (2008) Contributo para o estudo bioecológico de *Culex theileri* Theobald 1903 e *Ochlerotatus caspius* Pallas 1771 (Diptera Culicidae) na área da Comporta Alcácer do Sal. Perspectivas para o seu controlo. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: (inacessível)

RAMOS, Susana Garcia (2008) Studies on the mosquito immune response effect of antimalarial drugs and Plasmodium sporozoites -Glycosylphosphatidylinositol from Apicomplexan protozoa, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: (inacessível)

SOUSA, Carla Alexandra (2008) Malaria vectorial capacity and competence of *Anopheles atroparvus* Van Thiel 1927 (Diptera Culicidae) Implications for the potential re-emergence of malaria in Portugal, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa

Resumo: In Western-European Countries the risk of malaria re-emergence under current environmental and social conditions is considered minimal. However, in the last decade the number of imported cases has increased and

several autochthonous cases have been reported from malaria-free places. If the predicted global climate change or other environmental modification would cause a large increase in mosquito vectorial capacity, malaria re-emergence in Europe could become possible. To assess how environmental driven factors may be linked to the risk of re-introducing malaria in Portugal, one must start by characterising the current status of its former vectors. By studying the receptivity and infectivity of present-day mosquito populations, it will be possible to identify factors that may trigger disease emergence and spreading, as well as to provide entomological data to be used in the identification of environmental induced changes of epidemiological significance. Aiming at contributing to these goals, this study has focused on the following objectives: (i) to estimate *Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927 vectorial capacity towards malaria and analyse other bioecological parameters with relevance to the introduction of the disease; (ii) to determine *An. atroparvus* vector competence for tropical strains of *Plasmodium falciparum* Welch, 1897. The region of Comporta presents a unique setting to assess the vector capacity and competence of *An. atroparvus* from Portugal. It was a former malaria hyperendemic region, where *P. falciparum* was the most prevalent malaria parasite. It is a semi-rural area with vast numbers of mosquito breeding sites and a highly mobile human population due mainly to tourism. It is also located fairly close to Lisbon which allows frequent visits to the study area. Nine would be the maximum estimated number of new daily inoculations that could occur if an infective human host would be introduced in the area. This estimate was obtained for a sporogonic cycle of 11 days (compatible with *P. vivax* development under optimal conditions) and the highest man biting rate obtained in this study (38 bites *per person per day*). This value of C is similar to some obtained for other malaria vectors. However, due to the overestimation of most of the computed variables, one can foresee that the receptivity of the area to the re-emergence of the disease is very limited. With the exception of August 2001, the threshold of C=1 was only surpassed during winter/spring months, when parous rates were above 0.95 but abundances were lowest.

Out of 2,207 *An. atroparvus* that were sent to Nijmegen Medical Centre to be artificially infected with the tropical strains of *P. falciparum*, more than 790 specimens took one or two infected blood meals. *Anopheles atroparvus* females infection was successful in a single experiment. These specimens took two infective feeds with a seven days interval. Blood fed females were kept always at 26°C with the exception of a 19 hours period that occurred two hours after the second blood meal and during which mosquitoes were placed at 21°C. Out of the 37 mosquitoes that were dissected, five presented oocysts in their midguts. Prevalence of infection was 13.5% and the mean number of oocysts *per* infected female was 14, ranging between 2 to 75 oocysts *per* infected midgut. It was confirmed that *An. atroparvus* is, at the most, a low competent vector regarding tropical strains of *P. falciparum*. Artificial infection experiments were not carried out beyond the oocysts phase, thus no conclusion can be drawn regarding sporozoite formation and invasion of salivary glands. Nevertheless, *An. atroparvus* complete refractoriness to tropical *P. falciparum* strains seems less certain than at the beginning of this study.

This study has produced an update on the bionomics of *An. atroparvus* in Portugal and, for the first time, a comprehensive assessment of its vectorial capacity and competence for the transmission of human malaria parasites. It was also attempted to determine if the biology and behaviour of this species has suffered any major switches since the time malaria was an endemic disease in Portugal. The results obtained in this study support the idea that the

establishment of malaria in Portugal is a possible but unlikely event in the present ecological conditions.

ABRANTES, Patrícia Simões (2007) Efeito da cloroquina na modulação da resposta do mosquito vector à infecção por plasmodium, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

RESUMO

O desenvolvimento esporogónico do Plasmodio no mosquito é uma fase crucial do ciclo de vida do parasita que depende de como este interage com os factores agonistas e antagonistas do seu desenvolvimento. Enquanto, por um lado, a resposta de defesa do mosquito contribui para a diminuição do número de parasitas durante o ciclo esporogónico, alguns componentes da refeição sanguínea, por outro lado, favorecem a infecção, potenciando o risco de um aumento da transmissão. A presença do antimalárico cloroquina na refeição sanguínea do mosquito tem sido associada a um aumento da carga parasitária de *Plasmodium* no mosquito, o que nos levou a testar se este efeito seria causado pela interferência da cloroquina nos mecanismos de defesa do mosquito à infecção.

No presente estudo, procurou-se compreender qual o efeito da cloroquina na resposta do mosquito à infecção por *Plasmodium* sp., analisando-se o efeito deste fármaco na expressão de genes implicados na defesa de *Anopheles gambiae* s.s.. Para isso, utilizaram-se 2 abordagens: uma na qual se analisou o efeito da cloroquina na resposta imune do mosquito, especificamente na quantidade de transcritos das proteases serínicas *CLIPB1*, *AGSP24D*, *CLIPA2* e *Q17030* e dos péptidos antimicrobianos *gambicina*, *DEF1* e *CEC1*, previamente associados à infecção, usando RT-PCR em Tempo-real e, outra, na qual se analisou o efeito da cloroquina no transcrito de *A. gambiae*, usando Microarrays.

Em ambos os casos, o efeito da cloroquina foi analisado independentemente em mosquitos não infectados (*Chl 50*) e em mosquitos infectados com *Plasmodium berghei* (*Chl 50Pb*).

O presente trabalho mostra que a cloroquina tem um efeito supressor na transcrição de genes do mosquito implicados na defesa à infecção, actuando em diferentes processos, como a imunidade, a apoptose, o citosqueleto, a adesão e o stress oxidativo. Este efeito supressor nos mecanismos anti-*Plasmodium* de *A. gambiae*, contribui possivelmente para “fragilizar” o sistema de defesa do mosquito vector, o que poderá explicar ou estar na origem do aumento da carga parasitária associada à ingestão de cloroquina na refeição sanguínea.

Com a presente dissertação, espera-se ter contribuído para um melhor conhecimento dos efeitos da cloroquina em mosquitos *A. gambiae*, o vector mais importante da malária, e ter evidenciado a necessidade de uma melhor compreensão do impacto dos antimaláricos na transmissão dos parasitas.

NOGUEIRA, Maria Carvalho (2007) Estudos de biologia da multiresistência a antimaláricos em *Plasmodium falciparum* : transportadores ABC e genes de resposta ao stress oxidativo, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: A malária causada por *Plasmodium falciparum* é, em conjunto com a tuberculose e o HIV/SIDA, a maior causa de mortalidade mundial entre as doenças infecciosas. Nas últimas décadas, o controlo e tratamento da malária têm sido bastante dificultados pelo surgimento e disseminação da resistência parasitária aos antimaláricos mais utilizados, nomeadamente às quinoleínas.

O parasita encontra-se em fase de elevada actividade metabólica, nos estadios sensíveis às quinoleínas, correspondente à degradação da hemoglobina no vacúolo digestivo, a qual gera ferriprotoporfirina IX (FP-IX) e espécies reactivas de Oxigénio (ROS). A destoxificação destes grupos é efectuada por enzimas de resposta ao stress oxidativo, como a superoxidodismutase e as enzimas dos sistemas dependentes da tioredoxina e do glutatião (GSH). Os compostos resultantes são demasiado hidrofílicos para difundir através da membrana citoplasmática, necessitando de transportadores específicos da super-família de proteínas ABC. O facto de *P. falciparum* apresentar resistência a diferentes antimaláricos e a relação existente entre as proteínas ABC (nomeadamente das sub-famílias MDR/TAP e MRP/CFTR) e os fenótipos de multi-resistência, justificaram esta investigação.

No genoma de *P. falciparum* foram identificadas 18 novas ABCs e posicionadas em 8 sub-famílias.

A susceptibilidade *in vitro* de isolados de *P. falciparum* (recorrendo a testes O.M.S.), provenientes de São Tomé e Príncipe, Tailândia e Angola demonstrou resistência simultânea a mais de um fármaco e níveis distintos de susceptibilidade entre aquelas regiões. Ao efectuar um estudo de associação das alterações de sequência nos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* (identificadas no decorrer deste trabalho), os resultados demonstraram uma correlação positiva apenas na Tailândia, no respeitante à mefloquina, para os polimorfismos de *pfmrp1* (191Y e 347A) e para a presença de inserções/delecções nos codões 779 e 3591 em de *pfmrp2*. Usando PCR em tempo real e para os mesmos isolados, foi determinado o número de cópias dos transportadores ABC *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2*. Para os dois últimos apenas foi detectada uma cópia, mas para *pfmdr1* foi identificado aumento do número de cópias (mais de 2) associado a menor susceptibilidade ao mesmo fármaco, no mesmo País.

Em estudos de expressão dos genes codificantes de enzimas de resposta ao stress oxidativo (*pfFe-sod*, *pfy-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR* e *pf2-CysPx*) e de transportadores ABC *pfmrp1* e *pfmrp2*, verificou-se que são regulados no ciclo de desenvolvimento e que o gene *pfg6pd* apresentou um padrão de regulação consistente com um gene *housekeeping*. Duma forma geral a amplitude de variação da expressão (no sentido da diferença entre máximo e mínimo) dos genes ao longo do ciclo intra-eritrocitário em 3D7 (clone sensível) é maior do que a observada em Dd2 (clone resistente).

O aumento da expressão dos genes codificantes de enzimas do sistema de destoxificação dependente do glutatião, parece ocorrer na fase inicial do desenvolvimento do parasita (estadio de anel e trofozoíto), antes dos genes codificantes de enzimas do sistema de destoxificação dependente da tioredoxina visível em fase posterior (esquizonte). O aumento da expressão do gene *pfmrp1*, coincidiu com a função biológica (por analogia) de transporte de

xenobióticos atribuída às proteínas da sub-família ABCC. Pelo contrário, o padrão de expressão do gene *pfmrp2*, foi compatível com uma função de importação (de ex. glutatião). Este resultado é discutível.

Os perfis de expressão dos referidos 10 genes, indicam que a presença de CQ (dose IC50), altera significativamente a expressão no sentido do aumento de expressão (indução). Mais, a amplitude de variação de expressão dos genes é significativamente mais elevada no clone 3D7 (sensível) do que no Dd2 (resistente). Em geral não foi verificada diminuição (repressão) significativa da expressão dos genes em presença de CQ para as doses utilizadas (IC50). Os resultados dos estudos de estabilidade do mRNA, sugerem que o efeito de regulação da CQ se processa a nível transcripcional, e que a CQ não modifica a velocidade de degradação do mRNA destes genes.

RODRIGUES, Ana Afonso (2007) Studies on the genetics of artemisinin resistance in Malaria, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: A existência de estirpes de *Plasmodium falciparum* resistentes a múltiplos fármacos é um dos problemas mais graves no controlo da malária. Novos fármacos, como a artemisinina (ART) e seus derivados são cada vez mais utilizados no tratamento da malária e muito embora até ao momento não haja registos de fármaco-resistência estável à ART o seu surgimento seria desastroso devido á falta de alternativas.

A investigação apresentada nesta tese descreve a selecção de resistência estável à ART e ao artesunato (ATN) utilizando um modelo roedor de malária, o parasita *Plasmodium chabaudi chabaudi* (*Plasmodium chabaudi*). Dois clones de *Plasmodium chabaudi* diferentes, AS-15CQ e AS-30CQ, foram inoculados em murganhos que por sua vez foram tratados na presença de concentrações sucessivamente crescentes de ATN e ART, sendo que no final do processo de selecção de resistência, os parasitas obtidos apresentavam uma resistência de 6 e 15 vezes superior ao ATN e à ART, respectivamente, em relação aos parasitas iniciais. Os clones obtidos foram nomeados respectivamente AS-ATN (obtido a partir de AS-15CQ por selecção com pressão de ATN) e AS-ART (obtido a partir de AS-30CQ por selecção com pressão de ART). A resistência obtida durante o processo de selecção é estável após clonagem, congelamento/descongelamento, passagem sanguínea na ausência de pressão de fármaco e transmissão natural através do mosquito vector.

A sequência nucleotídica e o número de cópias dos genes previamente descritos na literatura como moduladores putativos de resistência à ART e seus derivados: *mdr1*, *cg10*, *tctp* e *atp6*; foi comparada entre parasitas resistentes e sensíveis, não tendo sido encontradas nenhuma alteração, quer na sequência quer no número de cópias destes genes. Posteriormente, numa tentativa de identificar os genes envolvidos na resistência à ART e ao ATN a técnica de *Linkage Group Selection* (LGS) foi utilizada. Para tal dois cruzamentos genéticos foram realizados. Estes cruzamentos foram realizados entre os clones fármaco-resistentes; AS-ART e AS-ATN e um clone geneticamente distinto dos anteriores e sensível aos fármacos em estudos, AJ. Após realização do LGS quatro *loci* genéticos; nos cromossomas de *P. chabaudi* 1, 2, 6 e 8 foram encontrados associados à resistência. Atendendo a

que, a selecção no cromossoma 2 era a mais forte, este *locus* foi submetido a subsequentes análises genéticas, tendo sido encontradas duas mutações diferentes (V739F e V770F) num gene que codifica para um enzima de desubiquitinação (gene *ubp-1*).

SANTOS, Ana Pereira dos (2007) *Anaplasma phagocytophilum* and human granulocytic anaplasmosis in Portugal, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: *Anaplasma phagocytophilum* and granulocytic anaplasmosis are of increasing interest to the scientific community as indicated by the expanding number of reports published in the past two decades, and especially since the emergence of the first cases of human granulocytic anaplasmosis (HGA). The growing recognition of the Public Health importance of *A. phagocytophilum* in North America and in Europe, along with its recent detection in Portugal has signalled the need for more detailed studies that address the emergence of HGA and its causative agent in our country.

Initially based on an methodological training in research units dedicated to Anaplasmatataceae, this work enabled the transfer of technology as currently applied to *A. phagocytophilum* research and made possible the development of a new line of investigation at *Centro de Estudos de Vectors e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (CEVDI/INSA)*. By establishing the foundations for concerted study on *A. phagocytophilum* and HGA, the work described herein has facilitated development of a broad approach toward fundamental issues in Anaplasmatataceae ecobiology and disease by focusing attention on identification of potential ixodid vectors, mammals likely to be involved in the infectious agent's life cycles either as reservoirs or affected hosts, and garnered the evidence indicating the potential for human exposure in Portugal.

The studies conducted in ixodid ticks proves the involvement of two *Ixodes* species in *A. phagocytophilum* cycles, including *Ixodes ricinus* on Madeira Island and *I. ventalloi* on the mainland. The detection of *A. phagocytophilum* DNA in *I. ricinus* reinforces prior studies and suggests its persistence on Madeira Island. This thesis also adds new data to the understanding of the natural history of *A. phagocytophilum* by providing the first evidence of infections in *I. ventalloi* ticks. The fact that some infected arthropods infest domestic cats not only mandates the inclusion of these mammals on the national list of vertebrate hosts parasitized by *I. ventalloi* ticks, but also shows their potential complicity in *A. phagocytophilum* maintenance. Moreover, molecular data shows the existence of *A. phagocytophilum* variant genotypes in Portuguese ticks. Partial gene sequences from infected ticks demonstrates nucleotide polymorphisms that support a close relationship of *A. phagocytophilum* on Madeira Island *I. ricinus* to North American strains isolated from humans as well as genotypes detected in Central and Northern Europe. Yet, these variants diverge from those found in mainland *I. ventalloi*, which represents a new genotype of undetermined pathogenicity.

Serological evidence of exposure to *A. phagocytophilum* or a close related agent is shown in *Mus spretus* mice, horses, and dogs in mainland. Molecular

analysis of biological samples from these animal populations provides the first definitive evidence of *A. phagocytophilum* active infection in Portuguese vertebrates with detection of its DNA in one seropositive horse from mainland Portugal, where the *A. phagocytophilum* genotype found is closely related to strains isolated from humans, suggesting the potential for HGA in Portugal. This thesis further extends study to identification of another closely related *Anaplasma* species, and its potential for serological cross-reactions with *A. phagocytophilum*, as evident with the detection of *A. platys* DNA in seropositive dogs. These data also underscore the importance of veterinarians maintaining vigilance for detection of not only granulocytic anaplasmosis but also canine infectious cyclic thrombocytopenia as causes of tick-borne diseases in Portugal. Both prospective and retrospective serological and molecular investigations of human exposure to *A. phagocytophilum* were performed on samples received at CEVDI/INSA for the laboratory diagnosis of patients with suspected tick-borne diseases during 2000-2006. The results provide evidence for seropositive Portuguese patients, including cases that fulfil serological criteria for HGA, although active infections were not detected. Moreover some seropositive patients had additional evidence of other tick-borne agents or related bacteria infections, including Lyme borreliosis, Q fever and bartonellosis. Although possibly false positive cross-reactions to shared antigens, these reactions potentially could be the result of active dual infections, or past exposure to several agents transmitted by *Ixodes* species. Overall, these results argue for continued development of improved *A. phagocytophilum* diagnostics, especially direct detection techniques, and integrated analysis of diagnostic tests for patients with suspected *Ixodes*-borne disease.

Although many aspects introduced and explored here will require expanded and more detailed investigations, this thesis contributes positively to a fundamental understanding of the extent to which *A. phagocytophilum* occurs in Portugal and its potential as a disease agent. It is hoped that these beginning studies will help to delineate new lines of research that more fully address granulocytic anaplasmosis and other emerging *Ixodes*-borne diseases.

ALVES, Maria Margarida (2006) Caracterização epidemiológica da criptosporidiose em Portugal, por estudo molecular de isolados de *Cryptosporidium* spp de humanos e de animais, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

RESUMO

Cryptosporidium spp. é um protozoário ubíquo causador de patologia gastrointestinal em humanos e animais. A infecção ocorre por ingestão de oocistos, após contacto directo com pessoas – transmissão antroponótica – ou outros animais infectados – transmissão zoonótica – podendo, ainda, ocorrer, indirectamente, através da água ou de alimentos contaminados. A importância relativa dos diferentes modos de transmissão, não se encontra, ainda, esclarecida.

A criptosporidiose humana está associada, sobretudo, à infecção por *C. hominis* e por *C. parvum*, embora se encontrem descritos, também, casos de

infecção por *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. canis*, *C. suis* e *Cryptosporidium* genótipo cervo.

Com o presente trabalho pretendeu-se determinar as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* que, em Portugal, se encontram associadas, quer à infecção humana, quer à infecção em gado doméstico, animais de companhia e animais silváticos, a fim de identificar, não só os parasitas infectantes para o Homem, como, também, os seus possíveis reservatórios zoonóticos. Para além disso, foi, ainda, objectivo deste trabalho, contribuir para a compreensão do papel desempenhado pelas vias de transmissão zoonótica e antroponótica na epidemiologia da criptosporidiose humana no nosso País.

Na população de infectados por VIH, com sintomatologia gastrointestinal, que estudámos, entre Junho de 2001 e Janeiro de 2005, foi encontrada a percentagem de infecção por *Cryptosporidium* spp. de 8,3% (18/217). Nos animais de companhia, a taxa de infecção obtida para gatos com dono e para cães com e sem dono foi de, respectivamente, 1,8% (2/109) e 0% (0/157). Nos animais silváticos de vida livre estudados, carnívoros e pequenos mamíferos, não foi encontrada infecção por *Cryptosporidium* spp.. Nos animais do Jardim Zoológico de Lisboa, apenas foram encontrados oocistos em duas amostras fecais de mamíferos, uma de um bisonte americano e, outra, de um gnu de cauda branca, correspondendo a uma percentagem de amostras positivas de 0,9% (2/217); também foram observados oocistos numa amostra fecal de uma tartaruga estrela indiana que havia chegado recentemente ao Jardim Zoológico.

A caracterização molecular de isolados humanos de *Cryptosporidium* spp., detectados entre 1994 e 2005, permitiu identificar, ao nível da espécie, 51 parasitas: 52,9% (27/51) pertenciam à espécie *C. parvum*, 31,4% (16/51) a *C. hominis*, 9,8% (5/51) a *C. felis* e 5,9% (3/51) a *C. meleagridis*. No que se refere aos criptosporídeos de hospedeiros não humanos – gado doméstico e ruminantes silváticos (gamos da Tapada Nacional de Mafra e Bovídeos do Jardim Zoológico de Lisboa), estudados retrospectivamente, e gatos e animais do Jardim Zoológico, estudados prospectivamente –, nos casos em que a amplificação do DNA foi bem sucedida, os resultados da sua caracterização molecular mostraram que: i) 94% (80/85) dos isolados bovinos e todos os isolados de ovinos (n = 2), de gamos da Tapada de Mafra (n = 4) e de Bovídeos do Jardim Zoológico (n = 11) pertenciam à espécie *C. parvum*; ii) 2,4% (2/85) dos isolados bovinos pertenciam à espécie *C. bovis*; iii) 2,4% (2/85) dos isolados bovinos pertenciam à espécie *C. andersoni*; iv) 1,2% (1/85) dos isolados bovinos pertenciam ao genótipo semelhante ao do gamo; v) os isolados detectados nos dois gatos pertenciam à espécie *C. felis*; vi) os parasitas encontrados nas fezes do bisonte americano, do gnu de cauda branca e da tartaruga estrela indiana pertenciam, respectivamente, ao genótipo rato, a um genótipo novo e ao genótipo tartaruga. Entre as espécies e genótipos identificados nos isolados animais, duas – *C. parvum* e *C. felis* – foram, também, encontradas em infecções humanas, facto que nos leva a considerar os seus respectivos hospedeiros – gado doméstico, ruminantes silváticos e gatos – como possíveis reservatórios zoonóticos da infecção humana.

A determinação da diversidade intra-específica de *C. hominis* e de *C. parvum* foi realizada por caracterização molecular de um locus de microssatélites – ML2 – e do gene GP60. A análise de fragmentos por metodologia fluorescente do STR ML2, revelou a ausência de variabilidade genética em *C. hominis* e permitiu caracterizar, somente, 47% (8/17) dos isolados de *C. parvum* humanos estudados; a presença de múltiplos picos nos electroforetogramas dos

restantes parasitas de origem humana e nos de todos os outros animais impediu a identificação dos seus alelos. Os dois alelos identificados nos oito isolados de *C. parvum* humanos – ML2-176 e ML2-191 – não foram encontrados em nenhum dos parasitas de gado doméstico ou de ruminantes silváticos. Em virtude da impossibilidade de identificar o alelo de todos os parasitas da espécie *C. parvum* em estudo, a caracterização do locus ML2 mostrou ser de pouca utilidade para o nosso trabalho. A caracterização do gene GP60, permitiu identificar nove famílias de subtipos, quatro em *C. parvum* e cinco em *C. hominis*. Entre os parasitas da espécie *C. parvum*, os de origem humana apresentaram maior variabilidade de subtipos do que os de gado bovino e de ruminantes silváticos. A maioria dos isolados de gado bovino (61/72), um de gado ovino, um de gamos da Tapada de Mafra e todos os dos Bovídeos do Jardim Zoológico (n = 9) apresentaram o mesmo subtipo – IIaA15G2R1 –, o qual foi, também, encontrado em nove isolados humanos. O segundo subtipo de *C. parvum* mais frequente em isolados bovinos – IIaA16G2R1 – não foi encontrado em isolados humanos. Os dois subtipos menos frequentes em gado bovino e ovino – IIaA17G1 e IIaA21G1 – foram, também, identificados em isolados humanos. Em alguns parasitas humanos de *C. parvum* foram, ainda, encontrados quatro subtipos, pertencentes a três famílias, não identificados nos isolados de gado doméstico ou de ruminantes silváticos – IIbA14, IIcA5G3, IIaA19G1 e IIaA22G1. O facto de, em Portugal, isolados de *C. parvum* com o mesmo subtipo terem sido encontrados em infecções, não só humanas, como, também, de gado doméstico e de ruminantes silváticos indica que a sua transmissão ao Homem pode ocorrer pela via zoonótica e, também, pela antroponótica. Ainda, a identificação, em isolados de *C. parvum* humanos, de famílias/subtipos não encontrados nos animais, coloca a hipótese destes parasitas serem transmitidos ao Homem, unicamente, pela via antroponótica. Em suma, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que, em Portugal, a transmissão de *C. parvum* ao Homem envolve dois grupos de parasitas, um constituído por aqueles que são transmitidos, quer pela via zoonótica, quer pela antroponótica e, outro, composto pelos que são veiculados, exclusivamente, pela via antroponótica.

LEIRIÃO, Patrícia Rodrigues (2006) Plasmodium-Hepatocyte interactions: implications for protection against Malária, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

A malária é uma das doenças infecciosas mais importantes a nível mundial, sendo anualmente responsável por mais de 1 milhão de mortes. O agente causador da doença é o parasita intracelular, denominado *Plasmodium*, que possui um ciclo de vida bastante complexo. A infecção tem início com a inoculação de esporozoítos através da picada de um mosquito fêmea *Anopheles*, o vector de transmissão da doença. Uma vez na corrente sanguínea, o esporozoíto migra até ao fígado onde infecta a célula hospedeira, o hepatócito. No fígado, o parasita replica-se e desenvolve-se até atingir o seu próximo estado de maturação – o merozoíto.

Dada esta complexidade, é natural que o *Plasmodium* provoque no hospedeiro uma variedade de mecanismos distintos, especialmente ao nível imunitário. Por isso, a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, contra o parasita, é

caracterizada como sendo complexa e específica em relação à espécie e ao estágio do mesmo.

De forma a adquirir uma resposta imune protectora contra a malária é necessário que o indivíduo seja infectado consecutivamente durante a vida. Mesmo assim o resultado obtido é apenas uma imunidade parcial contra o parasita.

Melhorias significativas têm sido registadas, no que diz respeito à compreensão dos mecanismos de protecção envolvidos na doença, assim como na identificação de novas moléculas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novas vacinas. No entanto, ainda não está disponível uma vacina que seja eficaz conferindo uma protecção total.

O uso de esporozoítos irradiados em imunizações induz uma protecção total contra a doença, que é mediada pela activação de linfócitos T CD8+ específicos para antígenos do parasita. O início desta resposta é mediado por células dendríticas, embora a origem dos antígenos intervenientes seja ainda desconhecida.

Os esporozoítos irradiados conseguem infectar os hepatócitos. Contudo, não são capazes de progredir para a fase sanguínea da doença. Este desenvolvimento incompleto da fase hepática é uma característica fundamental para que ocorra imunidade. Embora alguns dos mecanismos protectores induzidos pela infecção com esporozoítos irradiados já tenham sido identificados é, ainda, necessário proceder a uma caracterização detalhada dos mesmos.

Sendo o fígado um local de extrema importância durante o ciclo de vida do parasita da malária, qualquer descoberta ao nível das interacções que se estabelecem entre o *Plasmodium* e o hepatócito, terá uma repercussão no melhoramento do processo de indução de uma resposta imune contra a doença.

Utilizando um modelo murino, demonstrou-se que os hepatócitos infectados com esporozoítos irradiados entram em apoptose logo após o início da infecção. Durante esta fase as células dendríticas são recrutadas para o fígado, local onde fagocitam os corpos apoptóticos provenientes dos hepatócitos que entraram em morte celular. Uma vez que estas células são capazes de apresentar antígenos exógenos e ainda induzir o *priming* e activação das células T, os resultados por nós obtidos sugerem que os hepatócitos infectados apoptóticos são a fonte de antígenos do parasita utilizada pelas células dendríticas durante a iniciação de uma resposta imune contra a malária.

Durante o curso de uma infecção, a morte celular possui um papel fundamental no estabelecimento de uma resposta imune contra um agente patogénico. Os parasitas possuem a capacidade de modular esta resposta através da indução ou inibição da morte da célula hospedeira, de forma a possibilitar o seu desenvolvimento e sobrevivência.

Previamente, foi demonstrado que durante a migração dos esporozoítos através dos hepatócitos, as células atravessadas secretam um factor de crescimento específico, o HGF -“hepatocyte growth factor”, que aumenta a susceptibilidade celular à infecção. Esta via de sinalização iniciada pelo HGF através do seu receptor, o MET, provoca uma série de efeitos em diversos tipos de células. Entre eles destaca-se a protecção contra a morte celular programada. Considerando tal facto, estudou-se qual o efeito desta protecção durante a infecção por *Plasmodium*, tendo como hipótese que a activação da via de sinalização do HGF/MET induziria uma protecção da apoptose nas células infectadas. Os resultados por nós obtidos confirmaram esta teoria. A

inibição desta via de sinalização induziu um aumento na quantidade de morte celular observada.

Tendo em conta que, usualmente, a activação da sinalização do HGF ocorre segundo o sinal de transdução do PI3K/Akt, testou-se se o bloqueio desta via produzia algum efeito na infecção. De facto, os resultados observados indicam que esta via de sinalização é utilizada durante a infecção quando o HGF/MET é activado. Estas observações demonstram que a inibição da apoptose da célula hospedeira durante a infecção por *Plasmodium* é necessária para ocorrer doença.

Na parte final deste trabalho, procurou-se ainda identificar um gene do parasita responsável pela inibição da morte do hepatócito. Algumas observações preliminares levaram-nos a sugerir que a proteína HSP70 do parasita possa exercer uma função neste processo, daí que sugerimos que no futuro este envolvimento seja mais aprofundado.

Assim, os resultados apresentados nesta tese contribuem para um maior esclarecimento e compreensão das interações que se estabelecem no fígado aquando da infecção por *Plasmodium*, e para um conhecimento mais alargado da relação entre o parasita e o hepatócito.

SILVA, Marina Henriques da (2006) Estudo da resistência de *Pneumocystis jirovecii* ao cotrimoxazol em doentes com infecção VIH/SIDA, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: *Pneumocystis jirovecii* é um eucariota responsável por um quadro clínico de pneumonia intersticial grave em indivíduos imunocomprometidos.

Apesar do decréscimo da incidência da pneumonia por *P. jirovecii* (PPc) como resultado da introdução da profilaxia específica e da terapêutica antirretroviral potente (HAART, do inglês "Highly active antiretroviral therapy"), esta doença continua a ser uma das infecções oportunistas mais frequentes em doentes com infecção vírus da imunodeficiência humana/síndrome de imunodeficiência adquirida (VIH/SIDA) e com outras imunodeficiências. Os fármacos da família das sulfas, em especial o cotrimoxazol, uma combinação de sulfametoxazol e de trimetoprim, são considerados os agentes de primeira linha na profilaxia e no tratamento desta infecção.

Ao longo dos últimos anos, tem sido estudada a variabilidade genética da dihidropteroato sintetase (DHPS) e da dihidrofolato reductase (DHFR), duas enzimas alvo do cotrimoxazol, de *P. jirovecii* com o intuito de avaliar o possível desenvolvimento de resistência a este fármaco. Por outro lado, o estudo de outros marcadores genéticos, como as regiões dos espaçadores internos transcritos (ITS, do inglês "Internal Transcribed Spacers"), em conjunto com o DHPS e o DHFR, tem sido utilizado no sentido de melhor compreender os mecanismos de desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol.

Com o presente estudo, pretendeu-se efectuar a caracterização genética da DHPS, da DHFR e das regiões ITS de *P. jirovecii*, em isolados obtidos entre 1995 e 2004, em doentes imunocomprometidos. Também foi objectivo deste trabalho, estudar a relação dos genótipos identificados nas três regiões genómicas em análise, entre si e com diversas variáveis clínicas e epidemiológicas.

Entre os 403 isolados de *P. jirovecii*, obtidos entre 2001 e 2004, a percentagem de infecção por *P. jirovecii* observada foi de 64,5%. No total, 290 isolados de *P.*

jirovecii identificados no período de 2001–2004 (260 isolados) e entre 1995–2000 (30 isolados), foram submetidos ao estudo de caracterização genética, nos três *loci* em estudo.

Inicialmente, com o intuito de melhorar a técnica de amplificação do gene da DHPS de *P. jirovecii*, procedeu-se à filtração das amostras de secreções pulmonares, para remoção de DNA do hospedeiro contaminante, e foi elaborado um novo protocolo de amplificação. Apesar, de se ter verificado que o processo de microfiltração não promovia uma melhor amplificação de DNA específico de *Pneumocystis*, o protocolo de PCR “nested” desenhado contribuiu para a maior amplificação do gene da DHPS de *P. jirovecii* ($P < 0,001$).

A caracterização genética da DHPS e da DHFR, permitiu identificar o genótipo selvagem em 84,5% e 68,9%, respectivamente, dos isolados estudados. Em 15,5% dos isolados, observou-se a presença de genótipos mutantes nos codões 55 e 57 do gene da DHPS. Em relação ao gene da DHFR, 31,1% dos isolados apresentaram polimorfismos. No total, foram identificados nove locais de substituição: quatro substituições sinónimas, nas posições nucleotídicas 201, 272, 312 e 381; cinco substituições nucleotídicas não sinónimas nas posições 38, 68, 92, 154 e 200 que resultaram na alteração nos codões 13, 23, 31, 52 e 67, respectivamente. No estudo efectuado, verificou-se que as mutações do gene da DHPS, foram mais frequentes entre os isolados obtidos em 1995-2000 do que entre os isolados recolhidos entre 2001 e 2004 ($P=0,056$). Relativamente ao gene da DHFR e, em contraste com a maioria dos estudos publicados, observou-se uma elevada diversidade genética entre os isolados estudados.

Também, nas regiões ITS de *P. jirovecii*, foi observada uma elevada variabilidade entre os isolados estudados. No presente trabalho, 30 genótipos diferentes foram identificados, o que evidencia o elevado grau de diversidade genética destas regiões e a sua utilidade no estudo da transmissão e da epidemiologia da PPc. No estudo efectuado, os genótipos mais frequentes foram o Eg, o Cg e o Gg. Verificou-se que o genótipo Ne foi significativamente mais frequente entre 1995–2000 ($P= 0,026$) enquanto que o genótipo Eg foi mais frequente entre 2001–2004 ($P=0,011$).

Considerando a combinação dos genótipos identificados nestas três regiões genómicas, foram observados 50 haplótipos distintos em 100 isolados de *P. jirovecii*. A elevada diversidade intra-específica observada neste estudo multilocus demonstra o potencial que esta abordagem pode ter na diferenciação de tipos *P. jirovecii* distintos e a sua utilidade no estudo da transmissão e da epidemiologia da PPc. No estudo efectuado, polimorfismos nos genes da DHPS e da DHFR, presumidamente associados à exposição ao cotrimoxazol, foram detectados em doentes não expostos a este fármaco. Esta observação pode sugerir que estas sequências polimórficas possam ser adquiridos acidentalmente, por transmissão pessoa-a-pessoa ou através de uma fonte ambiental, e não somente por pressão selectiva do cotrimoxazol. Também, a identificação de genótipos idênticos, nas três regiões genómicas em estudo, em diferentes populações de doentes sugere a ocorrência de transmissão pessoa-a-pessoa. No geral, o presente trabalho contribuiu para a clarificação do papel das mutações nos genes da DHPS e da DHFR no possível desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol em *P. jirovecii* assim como para a melhor compreensão da transmissão e da epidemiologia da PPc.

VIEIRA, Maria Luísa Jorge (2006) Aspectos da caracterização antigénica e molecular da Leptospirose em áreas endémicas, Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, especialidade de Microbiologia. IHMT. Lisboa.

Resumo: A Leptospirose é uma zoonose re-emergente causada por espiroquetídeos patogénicos do género *Leptospira*. Em Portugal, é reconhecida, desde 1931, como uma importante doença infecciosa humana, cuja notificação é obrigatória desde 1986 para todos os serovares. Porém, devido ao acentuado polimorfismo clínico e à dificuldade de um diagnóstico laboratorial especializado, esta patologia nem sempre é confirmada. Com efeito, o isolamento do agente é difícil e o método convencional de diagnóstico, baseado no teste serológico de referência TAM (Teste de Aglutinação Microscópica), não é muito sensível na primeira semana da doença. Assim, foram três os principais objectivos desta dissertação: actualizar o padrão epidemiológico da Leptospirose, após uma extensa revisão bibliográfica da doença (Capítulos 1 e 2); esclarecer os aspectos imunológicos relacionados com os marcadores antigénicos que mais influenciam a regulação da resposta humoral na infecção humana, em particular, em área endémica (Capítulo 3); e, por último, promover a identificação molecular de alguns isolados de *Leptospira*, avaliar o respectivo poder patogénico no modelo murino e contribuir para o diagnóstico precoce da doença humana (Capítulo 4).

O primeiro dos temas investigados, com base no estudo retrospectivo de uma larga série de 4.618 doentes sintomáticos analisados representa uma caracterização única da epidemiologia da Leptospirose, em particular, na Região Centro do País, e nas ilhas de São Miguel e Terceira (Açores), nos últimos 18 e 12 anos, respectivamente. Foram confirmados 1.024 (22%) casos, com uma distribuição média de 57 casos/ano, sendo a maior frequência no sexo masculino (67%). As áreas analisadas corresponderam à maioria das notificações em Portugal, com uma taxa de incidência média anual nas ilhas muito superior à registada no continente (11,1 vs 1,7/100.000 habitantes, respectivamente). Os adultos em idade activa (25-54 anos) foram os mais afectados, nos meses de Dezembro e Janeiro. A doença foi causada por serovares de nove serogrupos presuntivos de *Leptospira interrogans sensu lato*, com predomínio de Icterohaemorrhagiae, Pomona e Ballum, em cerca de 66% dos casos. A seropositividade da Leptospirose esteve associada às formas anictérica e ictérica da doença, sendo evidente uma elevada sub-notificação (\cong 20 casos/ano). Foram detectados e analisados os diversos factores de risco, verificando-se um risco elevado de transmissão em áreas geográficas onde a circulação dos agentes zoonóticos se processa em ciclos silváticos e/ou domésticos bem estabelecidos. Este estudo confirma que a incidência da Leptospirose em Portugal tem aumentado nos últimos anos, particularmente, nos Açores, onde a seropositividade elevada e a ocorrência de casos fatais confirmam esta patologia como um problema emergente de Saúde Pública.

No âmbito do Capítulo 3, investigaram-se os aspectos imunológicos da Leptospirose humana na

Região Centro e nas ilhas de São Miguel e Terceira, caracterizando as proteínas e os lipopolissacáridos (LPS) envolvidos durante as fases aguda (estádio único) e tardia da doença (três estádios), através do *follow-up* serológico de 240 doentes com confirmação clínica e laboratorial de Leptospirose. Foram incluídos no estudo 463 soros, 320 (69%) dos quais, obtidos durante a fase de convalescença (até 6

anos após o início dos sintomas). Soros de dadores de sangue (n=200) e de doentes com outras patologias infecciosas (n=60) foram usados como controlos. As amostras foram testadas pela técnica de *Western Blot* com lisados de oito estirpes patogénicas pertencentes aos serogrupos mais prevalentes. O reconhecimento dos antigénios leptospíricos, nos quatro estádios evolutivos, resultou da detecção de reactividade específica anti-IgM e anti-IgG, nos diferentes *immunoblots*. Detectaram-se cinco proteínas *major* (45, 35, 32, 25 e 22 kDa) comuns a todos os serovares. Os soros estudados com as estirpes dos serogrupos homólogos, previamente identificados pela TAM, reagiram contra as proteínas de 45, 32 e 22 kDa, conhecidas como LipL45, LipL32 e LipL21, respectivamente, sendo estes, os antigénios imunodominantes durante o período estudado, nas duas regiões geográficas. Os doentes açorianos mostraram, ainda, uma reactividade elevada contra os LPS, cujo significado é discutido face aos resultados negativos dos soros controlo para os marcadores referidos. Esta investigação indica, pela primeira vez, uma forte persistência da resposta humoral e o importante papel protector da LipL45, Lip32 e LipL21, anos após o início dos sintomas.

Por último, procedeu-se à identificação de estirpes Portuguesas, isoladas de murinos e de um caso humano fatal (*L. inadai*), numa perspectiva polifásica de intervenção. Utilizaram-se três testes fenotípicos (testes de crescimento sob diferentes temperaturas e na presença de 8-azaguanina, a par de um teste de alteração morfológica induzida pela adição de NaCl 1M). Paralelamente, efectuaram-se ensaios de amplificação do gene *rrs* (16S ARNr) de *Leptospira* spp por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando um par de *primers* “universais” (331 pb) e um segundo par, que apenas amplifica o gene *secY* (285 pb) de estirpes patogénicas, para definição da identidade dos isolados em estudo. Da integração dos resultados obtidos, confirmou-se que estes ocupam uma posição taxonómica “intermédia” entre as leptospiras saprófitas e as patogénicas. Desenvolveu-se, ainda, uma investigação (complementar) “*in vivo*” do carácter taxonómico “intermédio” do referido isolado humano, por cultura e amplificação do respectivo ADN de tecidos de hamsters inoculados para o efeito. Esta metodologia molecular foi posteriormente utilizada, com sucesso, no diagnóstico precoce de doentes com Leptospirose, sendo uma mais-valia na confirmação laboratorial de infecção por *Leptospira*, na ausência de anticorpos específicos na fase inicial da doença.